



Universidad Nacional Autónoma de México
Doctorado en Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina

**Efecto de extractos y compuestos de *Parthenium hysterophorus* sobre
Helicobacter pylori y sobre algunos mecanismos de colonización.**

Tesis
que para optar por el grado de:
Doctora en Ciencias

Presenta:
Biól. JAZMÍN PATRICIA ESPINOSA RIVERO

Directora de Tesis
Dra. Irma Romero Álvarez
Facultad de Medicina

Comité Tutor
Dra. Erika Patricia Rendón Huerta
Facultad de Medicina
Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava
Instituto de Química

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. Julio de 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS:

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
NÚMERO DE BECARIO: 366598

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

ÍNDICE

Contenido	Página
i. RESUMEN	1
ii. ABSTRACT	3
iii. LISTA DE ABREVIATURAS	5
iv. LISTA DE FIGURAS	6
v. LISTA DE CUADROS	8
1. Introducción	9
2. Marco teórico	11
2.1 Hallazgo de <i>Helicobacter pylori</i>	11
2.2 Ubicación taxonómica de <i>H. pylori</i>	12
2.3 Generalidades microbiológicas de <i>H. pylori</i>	12
2.4 Vías de transmisión y prevalencia	14
2.5 Factores de patogenicidad	15
2.5.1 Mecanismos de colonización	15
2.5.2 Factores de virulencia	20
2.6 Patologías asociadas	21
2.7 Tratamiento de la infección por <i>H. pylori</i>	22
2.8 Plantas medicinales y terapias anti- <i>H. pylori</i>	23
2.9 <i>Parthenium hysterophorus</i>	25
2.9.1 Descripción botánica	25
2.9.2 Ubicación taxonómica	26
2.9.3 Sinonimias	27
2.9.4 Nombres comunes	27
2.9.5 Distribución geográfica	27
2.9.6 Información etnobotánica	28
2.9.7 Antecedentes farmacológicos y fitoquímicos	29
3. Justificación	32
4. Hipótesis	33
5. Objetivo general	34
5.1 Objetivos particulares	34
6. Desarrollo experimental	35
6.1 Recolección del material vegetal	35
6.2 Preparación de extractos de <i>P. hysterophorus</i>	35
6.3 Cultivo de <i>H. pylori</i>	35
6.4 Evaluación de la actividad anti- <i>H. pylori</i>	36
6.5 Efecto de los extractos sobre la motilidad de <i>H. pylori in vitro</i>	37
6.6 Evaluación de la actividad anti-ureasa de <i>H. pylori in vitro</i>	38
6.6.1 Análisis de resultados de la actividad anti-ureasa	40
6.7 Cultivo de células de adenocarcinoma gástrico (AGS)	41

6.7.1 Descongelamiento de células	41
6.7.2 Propagación celular	41
6.7.3 Criopreservación de células	41
6.8 Efecto de los extractos sobre la adherencia de <i>H. pylori</i>	42
6.9 Microscopía confocal	43
6.10 Fraccionamiento biodirigido del extracto DMPA	43
6.10.1 Obtención a mayor escala del extracto DMPA	43
6.10.2 Fraccionamiento primario del extracto DMPA	43
6.10.3 Fraccionamiento secundario del extracto DMPA	45
6.10.4 Aislamiento e identificación de partenina y coronopilina	46
6.11 Efecto de compuestos puros sobre la adherencia de <i>H. pylori</i>	47
6.12 Mecanismo de acción de la actividad antiadherente del extracto DMPA	47
6.13 Evaluación de la citotoxicidad de los extractos	48
6.14 Evaluación de la resistencia eléctrica transepitelial	49
7. Resultados y Discusión	51
7.1 Extractos de <i>P. hysterothorus</i>	51
7.2 Evaluación de la actividad anti- <i>H. pylori</i>	54
7.3 Efecto de los extractos sobre los mecanismos de colonización de <i>H. pylori</i>	56
7.3.1 Efecto de los extractos sobre la motilidad de <i>H. pylori in vitro</i>	56
7.3.2 Efecto de los extractos sobre la actividad de la ureasa de <i>H. pylori in vitro</i>	60
7.3.3 Efecto de los extractos sobre la adherencia de <i>H. pylori in vitro</i>	63
7.4 Fraccionamiento biodirigido del extracto DMPA	67
7.4.1 Fraccionamiento primario del extracto DMPA	68
7.4.2 Fraccionamiento secundario del extracto DMPA	72
7.5 Efecto de los compuestos puros sobre la adherencia de <i>H. pylori</i>	81
7.6 Mecanismo de acción de la actividad antiadherente del extracto DMPA	83
7.6.1 Efecto del ácido siálico y fucosa sobre la adherencia de <i>H. pylori</i>	84
7.6.2 Efecto del extracto DMPA sobre AGS o <i>H. pylori</i>	87
7.7 Evaluación de la citotoxicidad de los extractos	93
7.7.1 Evaluación de la viabilidad celular	93
7.7.2 Efecto del extracto DMPA sobre la integridad del epitelio	98
8. Conclusiones	100
9. Perspectivas	102
10. Referencias	103
11. Publicaciones	115

I.RESUMEN

Parthenium hysterophorus L. (Asteraceae) es una planta empleada en la medicina tradicional para tratar enfermedades gastrointestinales, entre ellas la gastritis. La bacteria *Helicobacter pylori* ha sido identificada como el agente etiológico de gastritis, úlcera péptica y adenocarcinoma gástrico. El 50% de la población mundial está infectado con esta bacteria y las terapias actuales para erradicarla fallan debido al incremento de la resistencia a antibióticos. Por tanto, es necesario buscar nuevas medidas para controlar la infección por *H. pylori*, ya sea erradicándola o previniendo su colonización en el estómago. En este estudio se investigó el efecto de *P. hysterophorus* sobre el crecimiento de *H. pylori* y sus mecanismos de colonización, especialmente la adherencia a células epiteliales.

Se prepararon 5 extractos empleando disolventes de distinta polaridad tanto de raíces como de partes aéreas de *P. hysterophorus* y se evaluó su efecto sobre el crecimiento de *H. pylori* mediante el método de dilución en cultivo líquido. Los resultados mostraron que los extractos orgánicos tuvieron efectos antibacterianos, particularmente los extractos diclorometano-metanólicos (DM) (CMI= 31.3 µg/ml), por el contrario, los extractos acuosos presentaron una actividad baja o nula.

Posteriormente se evaluó el efecto de los 10 extractos sobre los mecanismos de colonización: motilidad, enzima ureasa y adherencia. La motilidad se determinó en placas de agar suave en presencia o ausencia de los extractos. Se encontró una correlación directa entre la actividad anti- *H. pylori* y la inhibición de la motilidad. La actividad de la enzima ureasa se midió mediante la cuantificación colorimétrica del amonio liberado tras la incubación de la ureasa con urea en presencia o ausencia de los extractos. Observamos que la mayoría de los extractos orgánicos inhibieron la actividad enzimática hasta en un 46%, excepto el extracto diclorometánico de raíces, que inhibió el 74% con 500 µg/ml (IC₅₀ = 136.4 µg/ml). Posteriormente se evaluó el efecto sobre la adherencia mediante la cuantificación fluorométrica de bacterias marcadas con FITC adheridas a células de adenocarcinoma gástrico humano (AGS) tras su incubación simultánea con los extractos de *P. hysterophorus*. Los extractos inhibieron parcialmente la adherencia

bacteriana, en especial los extractos DM, que inhibieron el 70% a una concentración de 1 mg/ml.

Tras obtener estos resultados se fraccionó el extracto diclorometano-metanólico de partes aéreas (DMPA) mediante cromatografía en columna abierta con el objetivo de aislar los compuestos activos. Las fracciones primarias tuvieron mayor actividad que DMPA, pero las fracciones secundarias no superaron la actividad anti-adherente, por lo que se sugiere que los compuestos activos actúan de manera sinérgica. Por lo que se investigó el mecanismo de acción y la citotoxicidad del extracto DMPA.

Para evaluar el mecanismo de acción se cuantificaron las bacterias adheridas a células (AGS) tras su preincubación con el extracto o con dos moléculas inhibitoras de la adherencia, ácido siálico y fucosa. Los resultados indicaron que el extracto comparte el mecanismo de acción con ambas moléculas, uniéndose a las adhesinas bacterianas SabA y BabA, además de poseer otros compuestos activos con distinto mecanismo de acción.

La citotoxicidad de DMPA se evaluó mediante su efecto sobre la viabilidad celular y sobre la integridad de las uniones intercelulares. La viabilidad celular se cuantificó tras la incubación de DMPA con células AGS durante 1 o 24 h. Ésta evaluación se realizó a través del ensayo de MTT. Se encontró que tras 1 h de incubación, DMPA inhibió significativamente la viabilidad celular a 1 mg/ml y tras 24 h la inhibió casi en un 90%. La integridad del epitelio se evaluó mediante la cuantificación de la resistencia transepitelial en células AGS y LLC-PK1. El extracto DMPA no disminuyó significativamente la integridad del epitelio.

Los resultados del presente trabajo indican que *P. hysterophorus* presenta varias actividades biológicas que pueden actuar sinérgicamente contra *H. pylori*, de este modo se correlacionan los resultados obtenidos con el uso tradicional de la planta, por lo que se identifica su potencial en la búsqueda de compuestos puros anti-*H. pylori* e inhibidores de los mecanismos de colonización.

ii.ABSTRACT

Parthenium hysterophorus L. (Asteraceae) is a traditional medicinal plant used to treat gastrointestinal disorders, such as gastritis. *Helicobacter pylori* has been described as the etiological agent of gastritis, peptic ulcer, as well as gastric adenocarcinoma. 50% of the world's population is infected with this bacterium and the current therapy fails due to the increment in antibiotic resistance; therefore, it is necessary to find new approaches to control *H. pylori* infection, either by its eradication or by preventing the bacterial colonization. In this study we investigated the effect of *P. hysterophorus* extracts on *H. pylori* growth and upon its colonization-related factors, especially the adherence of the bacteria to epithelial cells.

Five different polarity extracts from roots and aerial parts of *P. hysterophorus* were obtained and evaluated *in vitro* against *H. pylori* growth by the broth dilution method. We observed that organic extracts inhibited *H. pylori* growth. Particularly, dichloromethane-methanol extracts (DM), (MIC =31.3 µg/ml). Aqueous extracts showed low or null activity.

After that, we evaluated effect of extracts against colonization factors: motility, urease and adherence. Motility was determined in soft agar plates. We found a direct correlation between antibacterial activity and inhibition of motility. Urease activity was measured by ammonia colorimetric quantification. Organic extracts inhibited the activity of the enzyme at best 46%, except for the roots dichloromethane extract which reached 74% of inhibition with 500 µg/ml (IC₅₀ = 136.4 µg/ml). Anti-adherence potential was measured by fluorometrical measurement of adhered *H. pylori* -FITC labeled on human gastric adenocarcinoma cells (AGS) after incubation in presence or absence of *P. hysterophorus* extracts. Plant extracts inhibited adherence in different ranges but the dichloromethane-methanol ones possessed the highest effect, with a 70% maximal inhibition at 1 mg/ml.

Then, we purified the dichloromethane-methanol extract from aerial parts (DMPA) by an open column chromatography in order to obtain active pure

compounds. Primary fractions had higher activity than DMPA, but secondary fractions did not were better, so we could suggest that active compounds synergically act. Then, we investigated the mechanism of action and cytotoxicity of DMPA.

In order to evaluate the mechanism of action, bacterium-adhered were quantified after preincubation with DMPA or sialic acid or fucose. The results showed that DMPA had the same mechanism of action of those molecules. DMPA adheres to SabA and BabA adhesins, and it has other compounds with different targets.

Cytotoxicity was evaluated by cellular viability and epithelial integrity. Cellular viability was measured by MTT assay after 1 or 24 h of AGS and DMPA incubation. Results showed that DMPA significantly reduced viability at 1 mg/ml. at 1 h, and it reduced 90% of cellular viability at 24 h. Epithelial integrity was measured by transepithelial electrical resistance quantifying in AGS and LLCPK1 cells. DMPA did not significantly reduced epithelial integrity

Considering all obtained results we concluded that *P. hysterothorus* has various biological activities that synergically act against *H. pylori* and are correlated with traditional use of this species and it is promising in searching of active compounds against *H. pylori* and its colonization factors.

iii. LISTA DE ABREVIATURAS

AGS:	Células de adenocarcinoma gástrico humano
AHA:	Ácido acetohidroxámico
APA:	Extracto acuoso de partes aéreas
AR:	Extracto acuoso de raíces
CCA:	Cromatografía en columna abierta
CCF:	Cromatografía en capa fina
CagA:	Toxina CagA
CLSI:	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI:	Concentración mínima inhibitoria
D:	Diclorometano
DM:	Diclorometano-metanol
D-MEM:	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMPA:	Extracto diclorometano-metanólico de partes aéreas
DMR:	Extracto diclorometano-metanólico de raíces
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DPA:	Extracto diclorometanólico de partes aéreas
DR:	Extracto diclorometanólico de raíces
FITC:	Isotiocianato de fluoresceína
H:	Hexano
HPA:	Extracto hexánico de partes aéreas
HR:	Extracto hexánico de raíces
LLC-PK1:	Células epiteliales derivadas de riñón porcino
IBP:	Inhibidor de la bomba de protones
IC ₅₀ :	Concetración inhibitoria media
LPS:	Lipopolisacárido
M:	Metanol
MALT:	Linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa
MPA:	Extracto metanólico de partes aéreas
MR:	Extracto metanólico de raíces
MTT:	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
OMS:	Organización Mundial de la Salud
RMN:	Resonancia magnética nuclear
PBS:	Buffer fosfato salino
rpm:	Revoluciones por minuto
TEER:	Resistencia eléctrica transepitelial
TLR:	Receptor tipo toll
SFB:	Suero fetal bovino
UFC:	Unidades formadoras de colonias
VacA:	Citotoxina vacuolizante

iv. LISTA DE FIGURAS

Contenido	Página
Figura 1: Morfología de <i>Helicobacter pylori</i> .	13
Figura 2: Bacilo de <i>H. pylori</i>	15
Figura 3: Conjunto de genes y reacción enzimática de Ureasa	17
Figura 4: Esquema de adhesinas de <i>H. pylori</i> y receptores del huésped.	19
Figura 5: <i>Parthenium hysterophorus</i>	25
Figura 6: Inflorescencia de <i>P. hysterophorus</i>	26
Figura 7: Distribución geográfica en México de <i>Parthenium hysterophorus</i>	28
Figura 8: Formación de indofenol	38
Figura 9: Elaboración y fraccionamiento de extracto DMPA	47
Figura 10: Esquema de la medida de la resistencia eléctrica transepitelial	50
Figura 11: Perfil metabólico de los extractos orgánicos de <i>P. hysterophorus</i>	53
Figura 12: Actividad anti- <i>H. pylori</i> de los extractos de <i>P. hysterophorus</i> y de metronidazol	55
Figura 13: Imágenes representativas de los halos de motilidad de <i>H. pylori</i> en placas de agar suave	57
Figura 14: Efecto de los extractos de <i>P. hysterophorus</i> sobre la motilidad de <i>H. pylori</i>	58
Figura 15: Efecto de los extractos de <i>P. hysterophorus</i> sobre la actividad de la ureasa de <i>H. pylori</i>	61
Figura 16: Efecto de los extractos de <i>P. hysterophorus</i> sobre la adherencia de <i>H. pylori</i> a células AGS	64
Figura 17: Efecto de controles positivos sobre la adherencia de <i>H. pylori</i> a células AGS	65
Figura 18: Imágenes en microscopio confocal de células AGS cocultivada con <i>H. pylori</i> -FITC y extracto	66
Figura 19: Perfil metabólico de los extractos DMPA de <i>P. hysterophorus</i>	68
Figura 20: Perfil metabólico de las fracciones primarias de DMPA	70
Figura 21: Perfil metabólico de las fracciones primarias 4, 6, 7 y 11 de DMPA	73
Figura 22: Perfil metabólico de las fracciones secundarias de DMPA.	75
Figura 23: Espectros de resonancia magnética nuclear	78
Figura 24: Efecto de partenina sobre la adherencia de <i>H. pylori</i>	81
Figura 25: Efecto de compuestos puros sobre la adherencia de <i>H. pylori</i> .	82
Figura 26: Efecto de la incubación simultánea de ác. siálico o fucosa con células AGS y <i>H. pylori</i>	84

Figura 27:	Efecto de la preincubación de ác. siálico o fucosa con células AGS o <i>H. pylori</i>	85
Figura 28:	Efecto de la preincubación secuencial de ácido siálico y fucosa con <i>H. pylori</i>	86
Figura 29:	Efecto de la preincubación de células AGS con DMPA o <i>H. pylori</i> con DMPA	88
Figura 30:	Efecto de la preincubación secuencial de células AGS con ác. siálico, fucosa y DMPA	89
Figura 31:	Efecto de la preincubación secuencial de <i>H. pylori</i> con ác. siálico, fucosa y DMPA	92
Figura 32:	Efecto de la incubación durante 1 h de los extractos de <i>P. hysterophorus</i> sobre la viabilidad celular de AGS	96
Figura 33:	Efecto de la incubación durante 24 h de los extractos de <i>P. hysterophorus</i> sobre la viabilidad celular de AGS	97
Figura 34:	Efecto del extracto DMPA sobre la Resistencia eléctrica transepitelial	99

v. LISTA DE CUADROS

	Contenido	Página
Cuadro 1:	Fraccionamiento primario del extracto DMPA de <i>P. hysterophorus</i>	44
Cuadro 2:	Fraccionamiento secundario del extracto DMPA de <i>P. hysterophorus</i>	45
Cuadro 3:	Rendimiento y denominación de los extractos	52
Cuadro 4:	Concentración mínima inhibitoria de los extractos	56
Cuadro 5:	Denominación, naturaleza y rendimiento de fracciones primarias de DMPA	69
Cuadro 6:	Actividad anti-adherente de fracciones primarias de DMPA	71
Cuadro 7:	Denominación, naturaleza y rendimiento de fracciones secundarias de DMPA	74
Cuadro 8:	Actividad anti-adherente de fracciones secundarias de DMPA	79

1. Introducción

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa que infecta al estómago humano causando múltiples patologías, como son: gastritis crónica activa, úlcera péptica, linfoma tipo MALT y cáncer gástrico (Lopes *et al.*, 2014). En 1994 fue clasificada como carcinógeno tipo 1 por la International Agency for Research on Cancer (IARC, 1994). Se estima que el 50% de la población mundial está infectado por la bacteria y en México se estima que el 66% es seropositivo (Torres *et al.*, 2005).

En los últimos años las enfermedades causadas por esta bacteria han cobrado importancia en la población mexicana. En 2014 hubo casi 1, 500,000 nuevos casos de gastritis, úlceras o duodenitis, ocupando el primer lugar como causa de enfermedad (Secretaría de Salud, 2014). Es evidente que es un problema actual de salud pública.

Los tratamientos utilizados para la erradicación de la infección son eficaces hasta en un 90% y la resistencia de la bacteria a los antibióticos es alta; además, su consumo trae como consecuencia múltiples efectos secundarios, incómodos para el paciente debido a las altas dosis que se emplean (O'Connor *et al.*, 2015).

Recientemente se ha evaluado la inhibición de los mecanismos de colonización de la bacteria como una opción en la erradicación de la infección. Los principales mecanismos de colonización son la motilidad, conferida por flagelos que permiten a la bacteria llegar a la mucosa gástrica (Howitt *et al.*, 2011), la enzima ureasa, que ayuda a la bacteria a neutralizar su microambiente y la adherencia a las células epiteliales gástricas, proceso fundamental en la infección.

Los enfoques etnomédico y etnofarmacológico han sido criterios de selección fundamentales en la búsqueda de agentes bioactivos. En este sentido, las plantas medicinales han sido utilizadas por siglos en los distintos sistemas de medicina tradicional en todo el mundo, especialmente contra enfermedades infecciosas de diferentes naturalezas (Samy y Gopalakrishnakone, 2010). México es un país megadiverso y por tanto rico en recursos. De las 3,000 especies de

plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana, un tercio se emplean en el tratamiento de desórdenes gastrointestinales (Argueta *et al.*, 1994).

Nuestro grupo de trabajo ha estudiado el potencial anti-*H. pylori* de plantas usadas en la medicina tradicional mexicana para problemas gastrointestinales, clasificándolas según su actividad de nula a alta (Castillo-Juárez *et al.*, 2009). Dentro de este contexto, se probó la actividad de *Parthenium hysterophorus*, planta herbácea utilizada en el tratamiento de la gastritis e infecciones estomacales, entre otros usos. El extracto acuoso mostró actividad moderada contra *H. pylori*, mientras que los extractos orgánicos tuvieron una actividad de buena a alta (Espinosa, 2010). Se ha reportado su uso como antimicrobiano (Malarkodi y Manoharan, 2013). Asimismo, esta especie, posee compuestos que han sido reportados con actividad anti-*H. pylori* (Martini *et al.*, 2009).

Por tanto, en este trabajo se investigó el efecto de los extractos de *P. hysterophorus* sobre los procesos de colonización de la bacteria que puedan ser utilizados como fármacos en la prevención y/o el tratamiento de las enfermedades relacionadas con *H. pylori*.

2. Marco teórico

2.1 Hallazgo de *Helicobacter pylori*.

El aislamiento e identificación de *H. pylori* se realizó cuando el patólogo Robin Warren observó un bacilo curvado, Gram negativo, microaerófilo en biopsias de la mucosa gástrica de pacientes con gastritis crónica y el gastroenterólogo Barry Marshall logró cultivarla. En 1983 publicaron la asociación de la presencia de esta bacteria con la gastritis y la úlcera péptica (Warren y Marshall, 1983). En 2005, les fue concedido el premio Nobel de Fisiología y Medicina por este hallazgo.

No obstante, varios investigadores habían reportado la presencia de bacterias en el estómago antes de 1983, por ejemplo Bottcher y Letullo, que en 1875 reportaron la asociación de una bacteria encontrada en úlceras con enfermedades gástricas (Gustafson y Welling, 2010). En 1889, W. Jaworski encontró bacterias de forma espiral en lavados gástricos humanos y las asoció con el desarrollo de úlceras gástricas (Konturek, 2003). Posteriormente, en 1906, W. Krienitz reportó la presencia de espiroquetas en el estómago de pacientes con cáncer gástrico (Kidd y Modlin, 1998). Incluso Murray Luck estudió la enzima ureasa encontrada en la mucosa gástrica, que se creía, era producida por las células de esta mucosa (Luck y Seth, 1925) y ahora se sabe que esta enzima es sintetizada por la bacteria para colonizar exitosamente el ambiente ácido del estómago. La trascendencia de estos descubrimientos ha revolucionado la manera de comprender las enfermedades gástricas y sus tratamientos a través del tiempo, ya que se estableció que su etiología es la infección por *H. pylori* y no los hábitos alimenticios o estrés del paciente.

2.2 Ubicación taxonómica de *H. pylori*. (Madigan, *et al.*, 2015)

Dominio: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Clase: ϵ -Proteobacteria

Orden: Campylobacterales

Familia: Helicobacteraceae

Género: *Helicobacter*

Especie: *Helicobacter pylori*

2.3 Generalidades microbiológicas de *H. pylori*.

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa, que mide entre 2 y 4 μm de largo y entre 0.5 y 1 μm de ancho. Su morfología típica es helicoidal, sin embargo se puede encontrar en forma de bacilos, o después de un tiempo prolongado de cultivo *in vitro*, en forma de cocos (Lopes *et al.*, 2014) (Fig.1). Se cree que la forma cocoide representa una forma de resistencia ya que es viable pero no cultivable (Enroth *et al.*, 1999; Azevedo *et al.*, 2007). *H. pylori* es una bacteria neutrófila y para poder habitar el estómago humano, que es ácido, produce a la enzima ureasa para poder neutralizar su microambiente. Conjuntamente, posee entre 2 y 6 flagelos unipolares que le dan la capacidad de trasladarse hasta la superficie del epitelio gástrico, donde el pH es cercano a 7. Esta bacteria es catalasa y oxidasa positiva, enzimas que la protegen de las especies reactivas de oxígeno producidas por las células huésped (Kusters *et al.*, 2006).

Al ser una bacteria microaerófila, su cultivo requiere un ambiente con 2-5% de O_2 y 5-10% de CO_2 , 37°C y humedad alta. Se le considera un organismo

fastidioso, que requiere medios de cultivo complejos suplementados con sangre o suero.

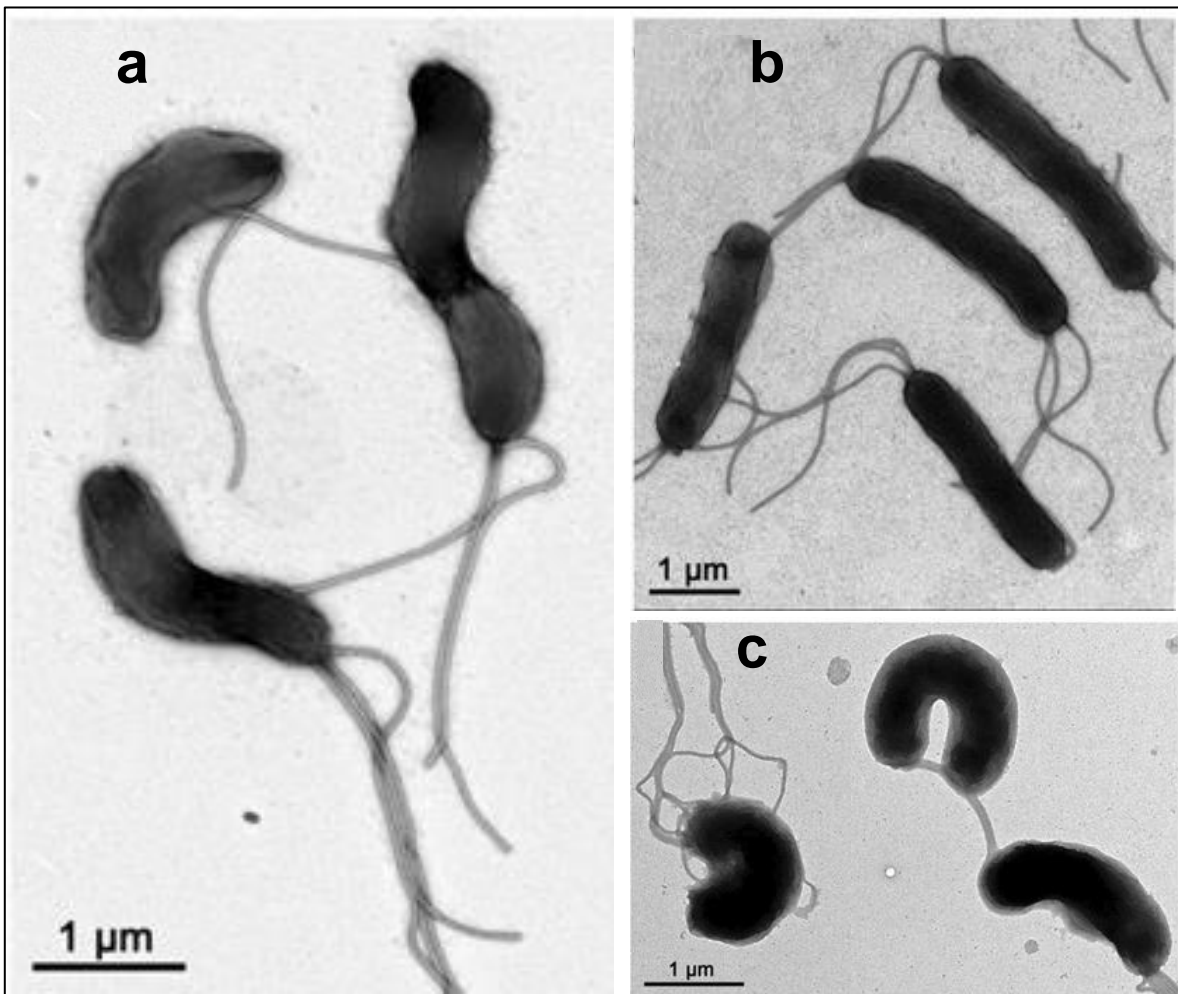


Figura 1. Morfología de *Helicobacter pylori*. a) Forma helicoidal. b) Forma bacilar. c) Forma de “c”. Microscopía electrónica de transmisión. (Modificado de Sycuro *et al.*, 2010).

2. 4 Vías de transmisión y prevalencia.

La manera por la cual se adquiere *H. pylori* no se ha entendido por completo, tomando en cuenta que la bacteria solo coloniza humanos y no se ha encontrado una asociación de su aislamiento en animales de compañía (Brown *et al.*, 2001; Dore *et al.*, 2001), la transmisión persona-persona es la más factible, a través de diferentes vías: gastro-oral, oral-oral y fecal-oral.

La vía gastro-oral ocurre en la infancia principalmente, a través del vómito o secreciones consecuentes de reflujo gástrico. *H. pylori* o su DNA ha sido encontrado en biopsias gástricas de niños (Allaker *et al.*, 2002) y se ha encontrado en el vómito a una alta concentración, 3×10^4 UFC /ml (Parsonnet *et al.*, 1999).

La vía oral-oral ha sido demostrada a través del aislamiento de DNA de *H. pylori* en saliva y placa dental o el aislamiento directo en cultivos de saliva (Ferguson *et al.*, 1999; Kabir, 2004).

La vía fecal-oral es la más evidenciada por el aislamiento de DNA de *H. pylori* en heces humanas y en cuerpos de agua (Enroth *et al.* 1995; Hegarty *et al.*, 1999; Kabir, 2004; Queralt *et al.*, 2005). Esta vía de transmisión podría explicar los índices de prevalencia de infección por *H. pylori* en el mundo.

Se estima que el 50% de la población mundial está infectada con *H. pylori*, pero este porcentaje varía según la región geográfica. En países desarrollados como EUA, Canadá, Suiza, Suecia, Australia o Países Bajos, el porcentaje de adultos infectados es de alrededor del 20%. No obstante, en países en vías de desarrollo, como India, los países de Latinoamérica y África, entre el 70 y 90% de los adultos están infectados, mientras que el 50% de los niños lo están a partir de los 5 años. Se piensa que la variación en la frecuencia de infección se debe a las condiciones de higiene, agua potable, dietas pobres y sobrepoblación (Organización Mundial de Gastroenterología, 2010). En México se ha reportado una seroprevalencia del 66% (Torres *et al.*, 2005).

2. 5 Factores de Patogenicidad.

2. 5.1 Mecanismos de colonización.

H. pylori ha desarrollado distintos mecanismos para sobrevivir y persistir en el ambiente hostil del estómago humano, entre ellos se encuentra la motilidad, la enzima ureasa y la adherencia a las células epiteliales gástricas. A continuación se detalla cada uno.

1. *Motilidad.* Esta bacteria tiene entre 2 y 6 flagelos unipolares de aproximadamente 3 μm de largo que le confieren movimiento hacia la zona mucosa del epitelio gástrico, donde es quimioatraída por el pH cercano a 7, urea y bicarbonato de sodio (O'Toole *et al.*, 2000; Schreiber *et al.*, 2004). El flagelo de *H. pylori* está formado por un cuerpo basal, gancho y filamento. El cuerpo basal está embebido en la pared celular y está formado de diversas proteínas y su función es proveer energía. El gancho tiene como función unir el cuerpo basal y el filamento, mientras que éste último está situado al exterior y tiene como función la propulsión. El filamento está formado por dos tipos de flagelina (Lertsehtakarn, *et al.*, 2011), esta flagelina es 1000 veces menos potente que la flagelina de otras bacterias para activar al receptor tipo Toll 5 (TLR5), encargado de activar una respuesta inmune. Esto puede contribuir a su éxito en la colonización y persistencia de la infección (Gewirtz *et al.*, 2004) (Fig. 2).

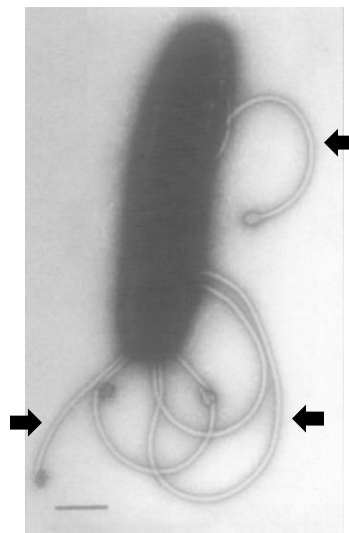


Figura 2. Bacilo de *H. pylori*. Las flechas denotan los flagelos. Microscopía electrónica de transmisión. Barra de referencia= 0.5 μm . (Modificado de Nobata *et al.*, 2002).

2. *Ureasa*. *H. pylori* es neutrófila y para poder colonizar el estómago, que tiene un pH de 1-2, emplea un proceso llamado “aclimatación ácida”, el cual consiste en mantener neutro el pH del periplasma y citoplasma aunque el medio sea ácido (Sachs, *et al.*, 2005). Esta extraordinaria habilidad le es conferida por la enzima ureasa, que se ubica en el citoplasma principalmente, esta enzima cataliza una reacción donde la urea producida por el huésped es convertida en NH_3 y CO_2 , alcalinizando el microambiente alrededor de la bacteria y el periplasma de la misma. El cluster de genes de la ureasa está formado de siete genes. Los genes *ureA* y *ureB* codifican para las subunidades A y B que forman la apoenzima (6A-6B) y se activa cuando se unen dos moléculas de Ni^{2+} a cada subunidad B. Esta adición la llevan a cabo las proteínas accesorias codificadas por los genes *ureE*, *ureF*, *ureG* y *ureH* (Mobley *et al.*, 1995). El gen *ureI* codifica para un canal dependiente de pH que se abre como respuesta a la acidez del medio, permitiendo la entrada de urea al citoplasma (Weeks *et al.*, 2000). Una vez que la ureasa hidroliza a la urea, sus productos difunden a través de las membranas; el NH_3 se protona, neutralizando el pH del medio; mientras que el CO_2 , junto con una molécula de agua son sustratos de la anhidrasa carbónica periplásmica que produce HCO_3^- y un H^+ , este último protona también a las moléculas de NH_3 resultante de la actividad de la ureasa y colabora en la neutralización del periplasma (Sachs, *et al.*, 2005) (Fig. 3).

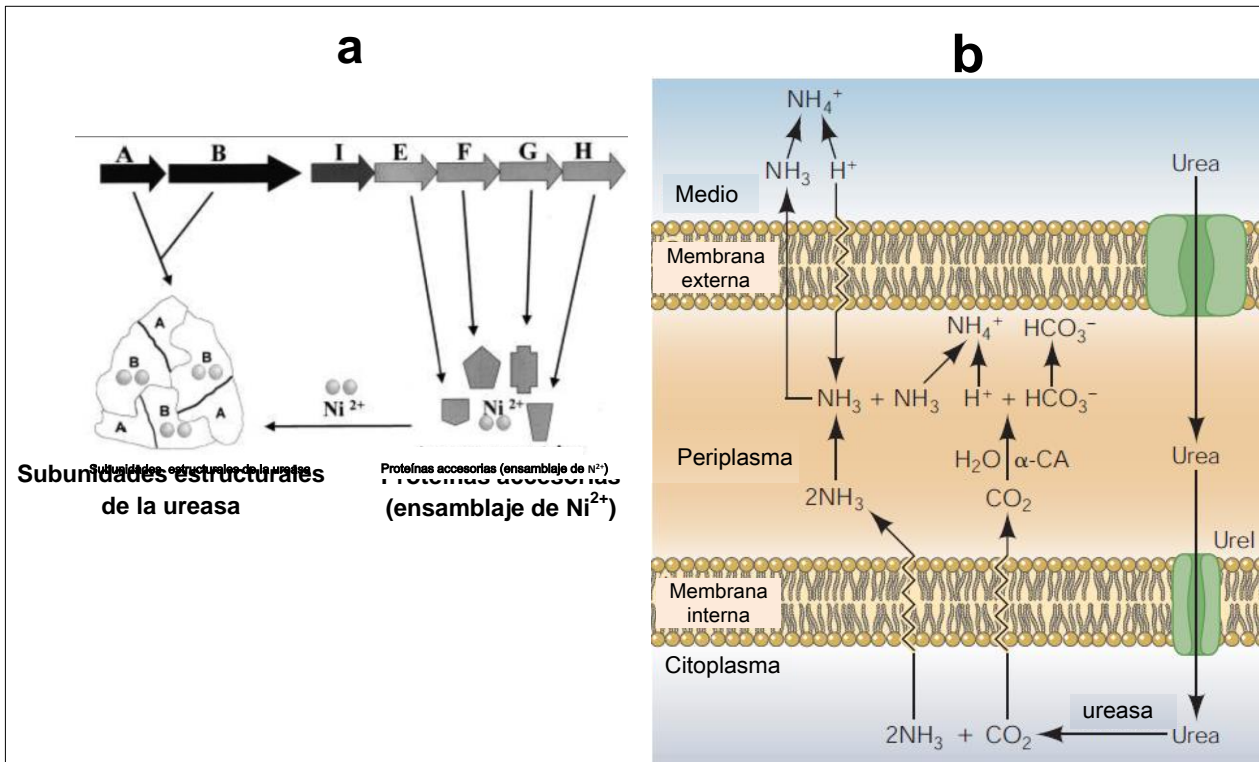


Figura 3. a) Conjunto de genes y función de proteínas expresadas de la enzima ureasa (Modificado de Mobley, 2001). b) Modelo de reacciones de aclimatación al ácido de *Helicobacter pylori*. (Modificado de Sachs *et al.*, 2005).

3. *Adherencia*. Una vez que *H. pylori* es quimioatraída por aminoácidos, urea y bicarbonato de sodio hacia la zona mucosa del epitelio, donde el pH es cercano a 7, la mayoría de las bacterias reside en las capas de moco y entre un 2 y 20% se adhieren a las células del epitelio gástrico (Hessey *et al.*, 1990; Kirschner *et al.*, 1995). Esta bacteria se adhiere principalmente a las células secretoras de moco que se encuentran en la zona antral del estómago, este proceso se da gracias a glicoproteínas o glicolípidos bacterianos llamados adhesinas que interactúan con receptores específicos del hospedero (Magalhaes *et al.*, 2010) (Fig. 4). Se han detectado cerca de 30 adhesinas distintas (Testerman *et al.*, 2001).

Dos de las más estudiadas son BabA y SabA. BabA se adhiere a los antígenos de Lewis B de las células epiteliales (Ilver *et al.*, 1998) a través de residuos de fucosa (Walz *et al.*, 2005). Esta adhesina se encuentra en el 60% de los aislados clínicos (Odenbreit *et al.*, 2009). SabA se une a diversos receptores en la células de la mucosa gástrica a través de ácido siálico (Aspholm *et al.*, 2006). Se dice que el 80% de los aislados clínicos presentan SabA, lo que sugiere que tiene un papel fundamental en la colonización de *H. pylori*, incluso la densidad bacteriana es mayor en pacientes infectados con cepas SabA positivas, que los pacientes infectados con cepas SabA negativas (Sheu *et al.*, 2006).

Hay otras adhesinas cuyo receptor también ha sido identificado; por ejemplo, las proteínas de choque térmico 60 (Hsp60) y 70 (Hsp70), que interactúan con sulfoglicolípidos de la membrana de la célula gástrica (Yamaguchi *et al.*, 1997; Huesca *et al.*, 1998), LabA, que se adhiere a la mucina MUC5AC (Rossez *et al.*, 2014); la adhesina NAP, cuyo receptor es un glicoconjugado sumamente específico (Teneberg *et al.*, 1997) y las adhesinas AlpA y AlpB (Odenbreit *et al.*, 1999), que se adhieren a la glicoproteína laminina (Senkovich *et al.*, 2011). Es importante destacar que AlpA y AlpB se encuentran presentes en el 100% de los aislados clínicos (Odenbreit *et al.*, 2009) y pudieran ser de gran importancia para el éxito de la colonización de *H. pylori*.

Algunas otras adhesinas cuyo receptor no ha sido identificado aún son: catalasa, HopZ (Peck *et al.*, 1999), HpaA, y otras proteínas de las cuales solo se conoce su peso molecular (Jones *et al.*, 1997; Kamiya *et al.*, 1998).

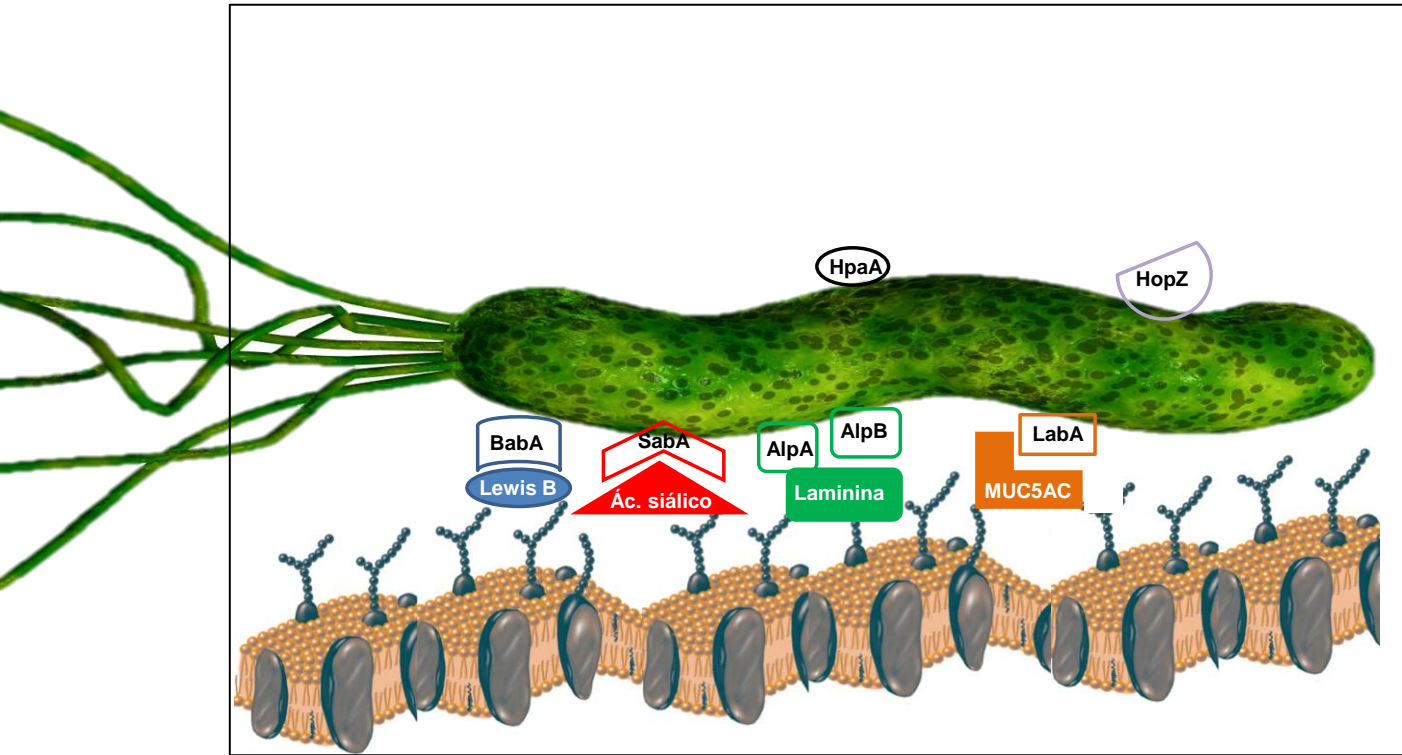


Figura 4. Esquema de adhesinas de *H. pylori* y receptores del huésped.

2.5.2 Factores de virulencia.

Una vez que *H. pylori* se establece en su nicho, utiliza diversas moléculas que le permiten sobrevivir, permanecer y causar daño en la mucosa. Algunas de ellas son:

1. Citotoxina Vacuolizante VacA. Esta proteína forma poros en las células, permitiendo la salida de aniones y urea, que pueden ser utilizados como sustratos metabólicos por la bacteria. Se ha reportado que al afectar a las mitocondrias, permite la liberación de citocromo C, conduciendo a la apoptosis de las células afectadas (Akazawa *et al.*, 2013). Además, se cree que afecta genes que regulan el ciclo celular, inhibe la proliferación de células T e induce la liberación de IL-8, provocando una respuesta inflamatoria aguda (Hisatsune *et al.*, 2008). Todas las cepas de *H. pylori* tienen el gen que codifica para VacA, no obstante, las variantes en la secuencia de algunos de sus dominios están relacionadas con la severidad de sus efectos (Isomoto *et al.*, 2010).
2. Citotoxina asociada al gene A. Esta toxina esta codificada dentro de la isla de patogenicidad *cag* (*cagPAI*) que contiene más de 30 genes. Entre los transcritos se encuentran un sistema de secreción tipo IV, que transloca a la toxina CagA hacia el interior de la célula gástrica, una vez dentro, es fosforilada e induce cambios en el citoesqueleto, activa a la proteínas cinasas activadoras de mitosis MAPK que regulan la proliferación y diferenciación celular, respuestas inflamatorias, entre otros efectos (Tohidpour, 2016). Las cepas que expresan CagA se asocian con el desarrollo de cáncer gástrico, la frecuencia de estas cepas es de entre 60 y 68% para países europeos y americanos (Odenbreit *et al.*, 2009; Chiurillo *et al.*, 2013), mientras que en los países asiáticos es del 90-100% (Yamaoka *et al.*, 1999; Wissesombat y Meethai, 2014).

3. Lipopolisacárido. El lipopolisacárido de *H. pylori* activa a las células fagocíticas, endoteliales, epiteliales y linfocitos provocando una respuesta inflamatoria. Además, posee antígenos Lewis X y Lewis Y como componentes del antígeno O, de este modo se mimetiza con las células del hospedero y evita su eliminación (Monteiro *et al.*, 1998).
4. OipA. Esta proteína se encuentra en la membrana externa de *H. pylori* y es responsable de provocar una respuesta inflamatoria dependiente de IL-8 (Yamaoka *et al.*, 2002). Este efecto parece estar sujeto a la presencia de CagA (Odenbreit *et al.*, 2009). Se sugiere que también está involucrada en la adherencia bacteriana (Dossumbekova *et al.*, 2006).

2.6 Patologías asociadas.

A pesar de que la mitad de la población humana está infectada con *H. pylori*, la mayoría de los infectados no presenta síntomas ni complicaciones clínicas evidentes.

La mayoría de los infectados desarrollan gastritis, que es una inflamación de la mucosa gástrica, provocada por los factores de virulencia y mecanismos de colonización. Los síntomas de esta patología incluyen ardor o dolor en la parte superior del abdomen, náuseas, vómito e inapetencia. Si la gastritis es de corta duración, se denomina gastritis aguda, pero si persiste por meses o años, se denomina gastritis crónica. Esta patología está asociada a la atrofia de la mucosa y metaplasia intestinal (Atherton, 2006).

Entre el 10 y 20% de los pacientes con *H. pylori* desarrollan úlcera péptica. Esta patología se caracteriza por la lesión de la mucosa, secundaria a secreción gástrica y ácido. Se produce daño vascular, una disminución en el aporte de nutrientes y necrosis en el tejido. Algunos síntomas son dolor abdominal punzante en la boca del estómago, sensación de hambre o vacío, náuseas y vómito. *H. pylori* es responsable del 80% de las úlceras gástricas y 95% de las duodenales (Atherton, 2006).

Una minoría de los infectados (1-3%) desarrolla cáncer gástrico, que es un crecimiento celular maligno originado en el epitelio del estómago, con capacidad metastásica. Esta enfermedad es la 3ª causa de muerte por cánceres a nivel mundial (Ferlay *et al.*, 2013). Se ha observado que los pacientes que desarrollan úlceras pépticas no presentan cáncer (Atherton, 2006).

El desarrollo y gravedad de las patologías causadas por *H. pylori* dependerá de la cepa bacteriana, fisiología, genética y hábitos del hospedero (Kusters *et al.*, 2006).

En México, las enfermedades causadas por esta bacteria se han convertido en un problema de salud pública, en 2014 hubo casi 1, 500,000 de nuevos casos de gastritis, úlceras o duodenitis, ocupando el primer lugar como causa de enfermedad (Secretaría de Salud, 2014).

2.7 Tratamiento de la infección por *H. pylori*.

Se ha propuesto que la infección crónica podría ser benéfica ya que evita la aparición de enfermedades gástricas como reflujo, cáncer de esófago y síndrome de Barret (Blaser, 2008). Sin embargo, en pacientes con úlcera péptica, gastritis atrófica, linfoma tipo MALT y antecedentes propios o familiares de cáncer gástrico, se recomienda erradicar la infección (Malfertheiner *et al.*, 2012).

El primer tratamiento al que se recurre es el “Tratamiento de primera línea”, que consiste en una triple terapia constituida por un inhibidor de la bomba de protones (IBP) y dos antibióticos (claritromicina, amoxicilina o metronidazol) durante 7 días. Este tratamiento tiene una efectividad del 80% (Malfertheiner *et al.*, 2012), mientras que si se sigue por 10 días, la efectividad aumenta al 90% (De Francesco *et al.*, 2014). Si el tratamiento de primera línea no logra erradicar la infección, se sigue el “Tratamiento de segunda línea”, en el cual se añaden sales de bismuto a una terapia cuádruple con dos antibióticos distintos a los empleados en el tratamiento de primera línea y un IBP durante 14 días. Este tratamiento tiene una efectividad de entre el 90 y 97.9% (Hwang *et al.*, 2011). En aquellos pacientes en los que la infección persiste tras un segundo curso de tratamiento se recomienda un cultivo de *H. pylori* donde se determine su susceptibilidad a

antibióticos para poder elegir los adecuados en el siguiente tratamiento (Malfertheiner *et al.*, 2012). En el “Tratamiento de tercera línea” se emplean quinolonas (levofloxaxina o moxifloxacina), rifabutina y furazolidona (Kusters *et al.*, 2006; Vakil *et al.*, 2007).

Uno de los principales problemas de estas terapias es la resistencia bacteriana, por lo que se sugiere que se elijan los antibióticos de acuerdo a la tasa de resistencia de cada región (Malfertheiner *et al.*, 2012). En México se ha calculado que hasta el 80% de las cepas de *H. pylori* es resistente al metronidazol, el 18% a la amoxicilina y entre el 5.5 y 24% a la claritromicina (López *et al.*, 1998; Torres *et al.*, 2001; Garza *et al.*, 2002; Ayala *et al.*, 2011). En la Guía de Práctica Clínica expedida por la Secretaría de Salud de México se cuenta con las recomendaciones adecuadas para la erradicación de *H. pylori* pero sin criterio para elegir si es necesaria su erradicación (Secretaría de Salud, 2011).

Debido al uso de varios fármacos simultáneamente durante periodos prolongados de tiempo, se presentan efectos secundarios y adversos que provocan el incumplimiento del tratamiento por parte del paciente. Esto da lugar a la generación de resistencia bacteriana. Por otra parte, el alto costo de los tratamientos puede implicar un gasto difícil de solventar para el paciente, conduciendo a la evolución de la infección en padecimientos más severos como la úlcera péptica y el cáncer gástrico (De Francesco *et al.*, 2012).

De tal manera que es importante buscar nuevos tratamientos y/o compuestos para controlar la infección de *H. pylori*, que sean más específicos, menos tóxicos y de fácil acceso a la población.

2.8 Plantas medicinales y terapias anti-*H. pylori*.

Las plantas medicinales han sido utilizadas por siglos en los distintos sistemas de medicina tradicional en todo el mundo, especialmente contra enfermedades infecciosas (Samy y Gopalakrishnakone, 2010). Actualmente, en países en vías de desarrollo, un gran porcentaje de la población todavía depende de su uso para la atención primaria de la salud (OMS, 2000), incluso en 1978, la

OMS recomendó la inclusión de medicinas tradicionales en la práctica terapéutica oficial (Akererele, 1998).

El estudio y comercialización de plantas medicinales ha aumentado tal que en países desarrollados se realizan investigaciones farmacológicas y se producen medicamentos a partir de plantas medicinales, tanto de compuestos activos como base de fármacos convencionales, como de preparados fitofarmacéuticos (Cañigüeral y Vila, 2003).

Se ha reportado que México tiene 3352 especies de plantas con uno o varios usos medicinales (Bye *et al.*, 1992), de ellas, un tercio se emplean en el tratamiento de desórdenes gastrointestinales (Argueta *et al.*, 1994).

Una vez que se identificó a *H. pylori* como agente etiológico de la gastritis y la úlcera péptica se comenzó a explorar el potencial de las plantas medicinales para inhibir el crecimiento de este organismo. Uno de los primeros reportes al respecto fue el de Cassel-Beraud y cols. en 1991 y hasta 2007 se enlistaron 327 plantas a nivel mundial con potencial anti-*H. pylori*. Castillo y Romero clasificaron sus efectos en: 1) Preventivo: plantas de uso frecuente en la dieta y que posiblemente previenen la colonización en el epitelio gástrico, 2) Atenuante: estas plantas disminuyen o retrasan el crecimiento de la bacteria, 3) Protector: disminuyen la inflamación y daño a la mucosa y 4) Eliminador: se han encontrado diversos agentes derivados de plantas con esta actividad *in vitro*, mas no *in vivo* (Castillo y Romero, 2007).

En nuestro grupo de trabajo se han estudiado cerca de 60 plantas usadas en la medicina tradicional mexicana con potencial anti-*H. pylori* (Castillo-Juárez *et al.*, 2009; Escobedo-Hinojosa *et al.*, 2012; Palacios-Espinosa *et al.*, 2014; Espinosa-Rivero *et al.*, 2015).

2.9 *Parthenium hysterophorus*.

Se eligió la planta medicinal *Parthenium hysterophorus* como objeto de estudio para el presente trabajo, con base en el criterio etnomédico, con el fin de avalar el uso tradicional que se le da a esta especie.

2.9.1 Descripción botánica.

Es una planta herbácea, erecta y ramosa de 50-80 cm y hasta 1.5 m de altura (Fig. 5), tiene hojas alternas, pecioladas, bipinnadas hasta de 20-30 cm de largo. El tallo es ramificado y estriado. Las flores se encuentran en cabezuelas en inflorescencias cimosas y pequeñas de color blanco que sobresalen del follaje. Tienen el involucre anchamente campanulado, de 2 a 3 mm de largo, receptáculo hemisférico, paleas de hasta 1.5 mm de largo, ensanchadas y pubescentes en el ápice, flores del radio con láminas de menos de 1 mm de largo, truncadas a emarginadas en el ápice; flores del disco aproximadamente 60, corolas de casi 1.5 mm de largo, angostamente infundibuliforme, sin pelos (Fig. 6).



Figura 5. *Parthenium hysterophours*. (Pedro Tenorio Lezama, 2006)



Figura 6. Inflorescencia de *P. hysterophorus* (Pedro Tenorio Lezama, 2006)

2.9.2 Ubicación taxonómica (APG II, 2003)

Reino: Plantae

Subreino: Traqueobionta

Superdivisión: Spermatophyta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Parthenium*

Especie: *Parthenium hysterophorus*

2.9.3 Sinonimias.

Argyrochaeta bipinnatifida Cav., *Argyrochaeta parviflora* Cav., *Echetrosis pentasperma* Phil., *Parthenium glomeratum* Rollins, *Parthenium lobatum* Buckley, *Parthenium pinnatifidum* Stokes, *Villanova bipinnatifida* Ortega (Missouri Botanical Garden, 2016).

2.9.4. Nombres comunes.

Esta planta se conoce como parthenium, congress grass, white top o Santa María en Estados Unidos; ajenjo, encaje, escoba amarga o escobilla en Honduras, (Missouri Botanical Garden, 2016). Santa María, escoba amarga, confitillo o artemisilla en Cuba (MINSAP, 1993); escoba amarga, parthenium, baja fiebre en Nepal (Maharjan *et al.*, 2007) y carrot weed, white top o gajar grass en India (Patel, 2011).

En México tiene más de 20 nombres comunes que dependen de la región en la que se encuentra. Entre ellos están: altamisa cimarrona, altamisa del campo, altimisilla, amargosa, arrocillo, artemis-uits, chaile, chachayatl, chochoyate, chuchuiate, cicutilla, cola de ardilla, confitillo, escobilla, estafiate, falsa altamisa, hierba de la oveja, hierba del burro, hierba del gusano, hormiguillo, huachochole, jihuite amargo, manzanilla del campo, romerillo, zacate amargo (Martínez, 1969; Villarreal, 1983; Ejemplares del herbario etnobotánico del IMSS, 2009). En maya se le conoce como hauay y en lengua huasteca es llamado tzaile y tzail-cuet (Martínez, 1969).

2.9.5 Distribución geográfica.

P. hysterophorus es nativa del noreste de México y endémica de América; sin embargo, en los años 1950's se introdujo accidentalmente en India, provocando también la colonización de África, Australia y Asia. Crece principalmente en climas cálidos y en altitudes bajas (Patel, 2011).

En México se distribuye en los estados de Aguascalientes, Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Colima, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo

León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luís Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz, Yucatán y Zacatecas (Villaseñor y Espinosa, 1998; Espinosa, 2010).



Figura 7. Distribución geográfica en México de *P. hysterochorus*. (Modificado de Espinosa, 2010)

2.9.6 Información etnobotánica.

Se han reportado diversos usos medicinales para *P. hysterochorus*. En varios países es empleada en el tratamiento de enfermedades de la piel, malaria, reumatismo y cefaleas (Raghu *et al.*, 2014).

Usando toda la planta, se utiliza como analgésico en reumatismo articular subagudo y reuma muscular, cefaleas y gastralgias (Martínez, 1969).

Con la infusión, se lavan los piquetes de mosquito (Zamora, 2015), el olor ahuyenta las pulgas; es utilizada contra el herpes, granos en la cabeza y contra la rabia (Aguilar *et al.*, 1994). Las raíces en decocción se utilizan en el tratamiento de la malaria (Caraballo *et al.*, 2004).

Asimismo hay una tendencia en el uso medicinal de esta planta, el tratamiento de enfermedades gástricas, a continuación se enlistan algunos ejemplos:

La decocción de la planta completa se toma como agua de tiempo para la infección en el estómago u otras enfermedades digestivas (Martínez, 1969; Argueta, 1994; Oudhia, 2001; Zamora, 2015)

La decocción de las raíces se emplea para tratar la disentería y dolor de estómago (CSIR, 2001; Oudhia, 2001; Magaña *et al.*, 2010; Raghu *et al.*, 2014).

Se utiliza para la gastritis, tomándose la infusión de las raíces de tres “matas” en un litro de agua dos veces al día (Comunicación personal del Sr. Abdón Espíndola Mérida).

2.9.7 Antecedentes farmacológicos y fitoquímicos.

La familia Asteraceae es conocida popularmente debido a que presenta el mayor número de especies de angiospermas con propiedades medicinales. Es por esto que se han estudiado los diversos componentes responsables de las actividades biológicas o farmacológicas.

Desde el punto de vista fitoquímico, *P. hysterophorus* ha sido ampliamente estudiado, es rico en flavonoides como el kaempferol, siringaresinol y la quercetina (Shen *et al.*, 1976; Rodríguez, 1977; Mears, 1980; Das *et al.*, 1999). Tiene compuestos fenólicos como ácido clorogénico (Patel, 2011) y fitoesteroles como campesterol, β -sitosterol y estigmasterol (Khan y Ahmad, 2008).

P. hysterophorus se caracteriza por la presencia de terpenos como el ácido ursólico, coronopilina, 2- β -hidroxicoronopilina, éter 3,7-dimetílico de quercetagenina, 3- β -acetoxineoambrosina; dentro del grupo de los sesquiterpenos se encuentran los pseudoguayanólidos como la partenina, hidropartenina, 4- β -acetoxi-11- β -13-dihidropartenina, histerina A-D, tetraneurina A (Rüesch y Mabry, 1969; Das *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2008; Shah *et al.*, 2009), y charminerona, éste último el primer seco-pseudoguayanólido reportado para la planta (Venkataiah *et al.*, 2003).

La partenina es el constituyente mayoritario de los metabolitos secundarios de la planta (Das *et al.*, 2007). Es sintetizada en los tricomas durante todo el ciclo de vida de la planta, en especial durante los estados generativos y dado que es

citotóxica para muchas especies de plantas y animales, es probable que ayude a la planta a propagarse sin perturbaciones (Das *et al.*, 2007; Belz, 2008).

En cuanto a los efectos biológicos de los extractos de *P. hysterophorus*, se han realizado diversos estudios, enfocados en la valoración del conocimiento tradicional.

El extracto etanólico de la planta fue evaluado *in vitro* e *in vivo* contra *Trypanosoma evansi*, resultando en la eliminación del parásito en dosis de 100 y 300 mg/kg de peso, aunque resultó tóxico en una dosis de 1000 mg/kg de peso (Talakal *et al.*, 1995).

El extracto etanólico de *P. hysterophorus* tiene efecto inhibitorio sobre *Plasmodium falciparum*, el organismo responsable de la malaria, con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 12.5 µg/ml (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2006).

El extracto etanólico de toda la planta fue probada en semillas de las malezas: *Bidens pilosa* (Asteraceae) y *Avena fatua* (Poaceae). Se observó que daña la membrana celular e inactiva a la enzima deshidrogenasa en las raíces, además de causar la pérdida de la clorofila en las hojas, lo que detiene su germinación y crecimiento (Pandey, 1996).

El extracto metanólico de las flores presentó una importante actividad antitumoral (Mukherjee y Chatterjee, 1993).

Se utilizaron los extractos metanólicos para realizar una prueba de dosis letal media en ratas, mediante administración oral e intravenosa, dando como resultado que la dosis letal es de 42 mg/kg (Narasimham *et al.*, 1984).

Se probó el extracto acuoso de las partes aéreas de *P. hysterophorus* en tres especies de hongos, *Drechlera tetrámera*, *Aspergillus niger* y *Phoma glomerata*, patógenos para muchas plantas utilizadas en la agricultura. Bajas concentraciones (10, 20 y 30% de extracto) mostraron actividad antifúngica, mientras que altas concentraciones no mostraron actividad alguna (Bajwa *et al.*, 2003).

El extracto acuoso de *P. hysterophorus* inhibió la germinación de *Raphanus sativus*, *Brassica campestris* y *B. oleracea* (Brassicaceae) cuando se aplicó a baja concentración. Tuvo efecto inhibitorio en la elongación de la raíz en *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Triticum aestivum*, *Artemisia dubia* y en *Ageratina aderophora* (Maharjan *et al.*, 2007).

El extracto acuoso de las flores tiene efecto hipoglucemiante en ratas diabéticas (Patel *et al.*, 2008).

El extracto acuoso a base de *P. hysterophorus* posee efecto insecticida y antialimentario sobre las larvas de *Spodoptera frugiperda* (Villate *et al.*, 2006).

Con el extracto acuoso se prepararon un champú y una loción y se aplicaron a perros infectados con escabiasis, observándose una mejoría (Águila *et al.*, 2000).

Se realizó un estudio donde se dañó con etanol el estómago de ratones, el cual es un modelo representativo de la enfermedad de la úlcera gástrica en humanos, encontrándose que el extracto acuoso tiene efecto gastroprotector (Bucciarelli y Skliar, 2007).

3. Justificación

El incremento de la resistencia de *Helicobacter pylori* a los antibióticos empleados en las terapias para su erradicación, causado por la falta de apego por parte de los pacientes debido a los múltiples efectos secundarios y el alto costo de dichas terapias, crea la necesidad de encontrar compuestos con actividad anti-*H. pylori* o que inhiban sus mecanismos para colonizar el epitelio gástrico, como son la motilidad, la enzima ureasa y la adherencia.

Por otra parte, *Parthenium hysterophorus* es una planta medicinal que se ha empleado para tratar múltiples enfermedades, entre ellas la gastritis. Basado en un criterio etnomédico y con el fin de contribuir a la validación de este recurso de la medicina tradicional, planteamos investigar el efecto de esta planta sobre *H. pylori* y los mecanismos de colonización antes mencionados.

4. Hipótesis

La mayoría de los casos de gastritis es causada por *Helicobacter pylori*, *Parthenium hysterophorus* es tradicionalmente usada para el tratamiento de la gastritis por lo que sus extractos podrían tener efecto sobre los procesos de colonización de la bacteria.

5. Objetivo general.

Estudiar el papel de los extractos de *P. hysterophorus* sobre algunos de los procesos de colonización de *H. pylori*.

5.1 Objetivos particulares.

1) Obtener extractos acuosos y orgánicos de las raíces y partes aéreas de *P. hysterophorus*.

2) Evaluar los extractos obtenidos sobre los siguientes parámetros de colonización: a) motilidad de la bacteria *in vitro*, b) actividad ureasa *in vitro* y c) adherencia de la bacteria en cultivos celulares *in vitro*.

3) Seleccionar y fraccionar de manera biodirigida un extracto para el aislamiento e identificación de los compuestos bioactivos.

6. Desarrollo experimental

6.1 Recolecta del material vegetal.

Se colectaron 17 kg de material vegetal en Cazones de Herrera, Veracruz. (20°41'42"N, 97°19'15"W). Un ejemplar fue identificado por la M. en C. Rosa María Fonseca Juárez y se depositó en el Herbario Nacional de México (MEXU) con el número de 1302111. El resto de las plantas se secó a temperatura ambiente y a la sombra.

6.2 Preparación de extractos de *P. hysterophorus*.

Dado que la información etnobotánica señala que la decocción de las raíces es la forma empleada como tratamiento, el material vegetal seco fue separado en raíces y partes aéreas y de ambos se obtuvieron extractos orgánicos de manera independiente, así como extractos acuosos de cada uno.

Para obtener los extractos orgánicos se emplearon 40 g de material vegetal para cada uno de los solventes. Se maceraron con 400 ml de hexano (H), diclorometano (D), diclorometano-metanol 1:1 (DM) o metanol (M) 3 veces durante 72 h cada uno.

Todos los extractos se concentraron en un evaporador rotatorio *in vacuo* para determinar su peso seco y rendimiento.

Para preparar los extractos acuosos se colocaron 40 g de material vegetal en 400 ml de agua destilada, dicha mezcla se llevó a ebullición durante 10 min y se dejó reposar por 24 h. Posteriormente se filtraron por gravedad y fueron liofilizados para obtener los extractos secos.

Para la evaluación del efecto de los extractos, los orgánicos se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) y los acuosos en agua destilada.

6.3 Cultivo de *H. pylori*.

Se utilizó la cepa ATCC 43504 (VacA y CagA positiva). Las bacterias se sembraron en cajas de agar Casman, suplementadas con 5% de sangre de carnero desfibrinada, vancomicina (10 µg/ml), trimetoprima (5 µg/ml), anfotericina

B (2 µg/ml) y polimixina B (2.5 µg/ml) y se incubaron durante 24 h bajo una atmósfera microaerofílica (5%O₂ y 10%CO₂) a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se colectaron las bacterias y fueron almacenadas hasta su uso en medio líquido Brucella suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 10% de glicerol. De manera rutinaria, la identificación de las bacterias se corroboró mediante pruebas bioquímicas (ureasa, catalasa y oxidasa), morfología en Tinción de Gram (Anexo 1) y la amplificación del gen *ureA* en PCR.

6.4 Evaluación de la actividad anti-*H. pylori*.

La actividad anti-*H. pylori* de cada extracto se evaluó mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), que es la concentración mínima para inhibir el 100% del crecimiento bacteriano; bajo el método de dilución en cultivo líquido (Palacios-Espinosa *et al.*, 2014). Los ensayos se realizaron bajo las recomendaciones del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

Para iniciar el ensayo, se cultivó *H. pylori* en medio líquido Mueller-Hinton suplementado con 0.2% de ciclodextrina y cuatro antibióticos (vancomicina 10 µg/ml, trimetoprima 5 µg/ml, anfotericina B 2 µg/ml y polimixina B 2.5 µg/ml) durante 5-6 h bajo una atmósfera microaerofílica (5%O₂ y 10%CO₂) a 37°C y 150 rpm. Durante este tiempo se alcanza el inicio de la fase exponencial de crecimiento bacteriano con una A₆₀₀= 0.3 y 1x10⁸ UFC/ml. Al llegar a este punto se tomaron 1.5 ml del cultivo, se colocaron en placas de 24 pozos, se adicionaron 10 µl de extracto disueltos en DMSO (1.9-250 µg/ml) y se tomó una alícuota para medir la absorbancia inicial (A_i) Tras incubar las bacterias en las condiciones previamente descritas durante 24 h, se midió la absorbancia final (A_f).

Se calculó la diferencia de las absorbancias

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

Para calcular el porcentaje de crecimiento de *H. pylori* se utiliza la media de las diferencias de crecimiento del grupo control (ΔA_c) y la de los tratamientos (ΔA_t)

$$\%C = (\Delta A_t \times 100) / (\Delta A_c)$$

La fórmula para determinar el porcentaje de inhibición de *H. pylori* para cada tratamiento es la siguiente:

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

Para validar los resultados se utilizaron como controles negativos DMSO y agua destilada para el caso de los extractos acuosos. Como control positivo se utilizaron los antibióticos: amoxicilina (0.005-0.1 µg/ml) claritromicina (0.5-5 µg/ml) y metronidazol (100-400 µg/ml). Se realizaron tres replicas independientes en cada experimento.

6.5 Efecto de los extractos sobre la motilidad de *H. pylori* in vitro.

Se sembró a *H. pylori* en cajas de agar Casman suplementadas con vancomicina (10 µg/ml) y se incubaron por 24 h, posteriormente se resuspendieron en medio líquido Mueller-Hinton (descrito en sección 6.4). Se ajustó la $A_{600}=1.0$ y 10 µl de la suspensión de las bacterias se sembró en placas de agar suave (medio Brucella Broth suplementado con 0.35% de agar, vancomicina 10 µg/ml, trimetoprima 5 µg/ml, anfotericina B 2 µg/ml y polimixina B 2.5 µg/ml) en presencia o ausencia de los extractos a cada una de sus CMI y diluciones seriadas 1:1. En el caso de HR y HPA, debido al bajo rendimiento obtenido, se evaluaron a partir de la mitad de la CMI. Se incubaron a 37°C y condiciones óptimas (sección 6.3) durante 7 días. Transcurrido el tiempo, se midió el área de crecimiento y halo de motilidad con el programa ImageJ®. La suma de estas áreas se denomina área total (At). Se utilizó como control negativo DMSO, el cuál no tuvo efecto sobre la motilidad.

El porcentaje de inhibición se determinó empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición de la motilidad} = \left(\frac{At(\text{control negativo}) - At(\text{tratamiento})}{At(\text{control negativo})} \right) \times 100$$

Se promediaron los resultados de tres experimentos, cada uno con nueve réplicas, y se realizó un análisis de varianza para saber los grupos con diferencia significativa respecto al control ($p \leq 0.05$).

6.6 Evaluación de la actividad anti-ureasa de *H. pylori in vitro*.

Para este ensayo se sembró *H. pylori* en medio Mueller-Hinton (descrito en la sección 6.4) y se incubó bajo condiciones óptimas de crecimiento durante 5 h. Una vez que el cultivo alcanzó una $A_{600}=0.5$ ($\sim 1 \times 10^8$ UFC/ml), las bacterias se cosecharon mediante centrifugación a 4°C (10 min a 5000 rpm), se lavaron y diluyeron en buffer fosfato salino (PBS) pH=7.2 y un cocktail de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich). Posteriormente las bacterias fueron lisadas con un sonicador (Branson 250) a 40 watts durante 90 seg. en un baño de hielo. El extracto de bacterias lisadas fue la fuente de ureasa. La concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford utilizando albúmina de suero bovina como proteína estándar. El extracto de bacterias se almacenó a 4°C hasta su utilización.

La actividad de la ureasa se midió en un microensayo en placas de 96 pozos con enzima preincubada en ausencia o presencia de los extractos (62.5-500 $\mu\text{g/ml}$). Se utilizó como control positivo ácido acetohidroxámico (AHA), inhibidor competitivo de la ureasa a concentraciones finales de entre 6.3 y 200 $\mu\text{g/ml}$.

La actividad enzimática se midió cuantificando el amonio liberado, producto de la hidrólisis de urea. Esta cuantificación se realizó basándose en la reacción de Berthelot (Weatherburn, 1967) respecto a una curva patrón cuya fuente de amonio fue $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

El amonio reacciona con el hipoclorito y forma cloraminas, que a su vez reaccionan con el fenol para formar monocloroquinoiminas. Finalmente, estos intermediarios reaccionan con una segunda molécula de fenol para formar el indofenol (Fig. 8)

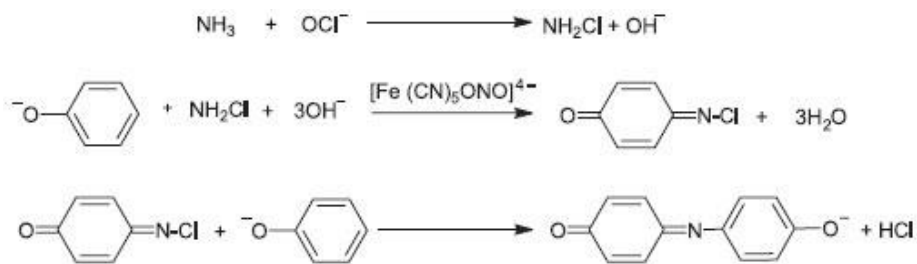


Figura 8. Formación de indofenol. Modificado de Afkhami y Norooz-Asl, 2008.

Reactivos para el método:

Solución A: Fenol 0.714 M

Solución B: NaOH 0.714 M / NaClO 0.059 M

Urea 75 mM

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

Condiciones:

1. Control negativo (C). Se colocaron 100 μl de ureasa (5 μg de proteína, equivalente a 1×10^7 UFC) y se aforó a 140 μl con PBS. Se dejó incubar durante 10 min a 37°C. Posteriormente se añadieron 10 μl de urea (Cf= 5 mM) y esta reacción se incubó por 10 min a 37°C. Pasado este tiempo se añadieron 50 μl de solución A a cada pozo y 100 μl de sol B. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 5 min aprox. y se midió a A_{600} .
2. Control solo ureasa (us). Se colocaron 100 μl de ureasa (5 μg de proteína, equivalente a 1×10^7 UFC) y se aforaron a 150 μl con PBS pH=7.2. Se dejó incubar durante 20 min a 37°C, 10 min previos a la adición de urea en las otras condiciones y 10 min posteriores a ello. Pasado este tiempo se añadieron las soluciones A y B y se midió la A_{600} .
3. Control solo urea (ur). Se colocaron 10 μl de urea (Cf=5 mM), se aforó a 150 μl con PBS y se incubó por 10 min a 37°C. Posteriormente se añadieron las soluciones A y B y se midió la A_{600} .
4. Experimental (e). Se colocaron 100 μl de ureasa (5 μg de proteína, equivalente a 1×10^7 UFC), 10 μl de tratamiento y se aforó a 140 μl con PBS. Esta mezcla se dejó incubar durante 10 min a 37°C. Posteriormente se añadieron 10 μl de urea (Cf=5 mM) y la reacción se incubó por 10 min. A continuación se añadieron las soluciones A y B y se midió la A_{600} .
5. Control solo tratamiento (t). Se colocaron 10 μl de tratamiento y se aforó a 150 μl con PBS. Se dejó incubar durante 20 min a 37°C. (10 min. previos a

la adición de urea y 10 min. posteriores) En seguida se añadieron las soluciones A y B y se midió la A_{600} .

6. Curva patrón de amonio. Al finalizar los 20 min totales de incubación se añadieron 10 μ l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a diferentes concentraciones, se aforó a 150 μ l con PBS, se añadieron las soluciones A y B y se midió la A_{600} .

6.6.1 Análisis de resultados de la actividad ureasa.

Una vez obtenidos los valores, se restaron del control positivo (C) la suma de las medias de ureasa (us) y las de urea (ur) Se obtuvo el valor que corresponde al 100 % de actividad ureasa.

$$C - (us + ur) = 100 \% \text{ actividad.}$$

Asimismo, a los valores de cada condición experimental se les restó la suma de las medias de (us), las de urea (ur), así como el control de tratamiento (t) para cada concentración utilizada.

Igualmente, se calculó la media de los valores obtenidos por cada cantidad de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ y se realizó una curva patrón.

Para calcular la cantidad de NH_4^+ liberada en cada condición experimental se utilizó la ecuación de la recta:

$$y = mx + b$$

Se calculó la actividad ureasa en nanomoles $\text{NH}_4/\text{min}/\text{mg}$ de proteína y se calculó el porcentaje de inhibición de cada tratamiento utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{nanomoles } \text{NH}_4/\text{min}/\text{mg de proteína}(\text{control negativo}) - \text{nanomoles } \text{NH}_4/\text{min}/\text{mg de proteína}(\text{experimental})}{\text{nanomoles } \text{NH}_4/\text{min}/\text{mg de proteína}(\text{control negativo})} \times 100$$

Se promediaron los resultados de al menos tres experimentos, cada uno por triplicado, y se realizó un análisis de varianza para saber los grupos con diferencia significativa respecto al control. ($p \leq 0.05$).

6.7 Cultivo de células de adenocarcinoma gástrico (AGS).

Para evaluar el efecto de los extractos sobre la adherencia bacteriana se emplearon células de adenocarcinoma gástrico (AGS) ATCC 1739.

6.7.1 Descongelamiento de células.

Se descongelaron las células contenidas en crioviales y se colocaron en tubos cónicos de 15 ml con 1 ml de medio modificado de medio Basal Medium Eagle (GIBCO) suplementado con 5% de SFB, 2 mM de L-Glutamina (GIBCO), 10 µg/ml de insulina, 2 mM de piruvato de sodio (GIBCO) y 100 U/ml/100µg/ml de penicilina/estreptomicina (GIBCO) (D-MEM). Posteriormente se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min, se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en medio D-MEM para después ser sembradas en una caja de Petri p-100 con 7 ml de medio D-MEM e incubadas a 37°C y 5% CO₂.

6.7.2 Propagación celular.

Una vez que la confluencia celular alcanzó ~80%, se retiró el medio de cultivo, se lavó con PBS, se agregó Tripsina-EDTA y se incubó por 5 min a 37°C para lograr el desprendimiento y desagregación de las células. Esta actividad proteolítica se interrumpió con la adición de 2 ml de medio D-MEM y la resuspensión de las células. La suspensión se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se añadió nuevamente medio D-MEM. Después se tomó una alícuota de 10 µl para contar las células con una cámara de Neubauer. Las células se sembraron nuevamente en cajas de Petri con medio fresco, que fue reemplazado cada 2 días.

6.7.3 Criopreservación de células.

Las células AGS se congelaron para almacenarlas y utilizarlas a lo largo de los experimentos evitando la transformación celular y contaminación de la línea celular. Para congelarlas, se retiró el medio a cultivos con una confluencia ~80%, se lavó con PBS y se añadió Tripsina-EDTA. Tras la recuperación de las células mediante centrifugación y contarlas, se almacenaron 1×10^6 células en un vial con 1ml de medio D-MEM y 10% de Glicerol a -70°C.

6.8 Efecto de los extractos sobre la adherencia de *H. pylori*.

Para realizar este ensayo se cuantificó fluorométricamente *H. pylori* tras ser cocultivada con células AGS en presencia o ausencia de los extractos.

Inicialmente, se colectaron las bacterias de un cultivo líquido (descrito en la sección 6.4) al inicio de la fase logarítmica de crecimiento, se lavaron mediante centrifugación a 5000 rpm durante 5 min y se suspendieron 1×10^9 UFC por cada ml de PBS. A esta suspensión se le añadieron 10 μ l de isotiocianato de fluoresceína 0.1% (FITC) disuelto en DMSO y se incubó durante 1 h a 37°C en oscuridad. A continuación, la suspensión se centrifugó a 1500 rpm por 1 min para eliminar el exceso de FITC y se lavó con PBS.

24 h previas al ensayo se sembraron 1×10^5 células AGS/pozo en una placa de 96 pozos con 200 μ l de D-MEM y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ para permitir la formación de la monocapa celular. Transcurrido el tiempo, el cultivo se lavó con PBS y se añadieron 1×10^8 UFC contenidas en 20 μ l de *H. pylori* marcadas con FITC a 100 μ l de D-MEM sin suplementar. Enseguida se añadieron 10 μ l de tratamiento (0.025-1 mg/ml) y se incubó por 1 h a 37°C y 5% de CO₂. Después, las células se lavaron con 50 μ l de PBS para eliminar las bacterias que no se adhirieron y el remanente de extracto; los pozos se aforaron a 300 μ l con PBS y la fluorescencia se midió en un espectrofluorómetro (POLARstar Omega®) a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 544 nm.

La inhibición de la adherencia se determinó a través de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición de la adherencia} = \left(\frac{\text{fluorescencia (control negativo)} - \text{fluorescencia (tratamiento)}}{\text{Fluorescencia (control negativo)}} \right) \times 100$$

Se utilizaron como controles positivos compuestos que inhiben la adherencia mediante un mecanismo conocido: 1) unión a la adhesina bacteriana SabA: fetuina (Kobayashi *et al.*, 1993) y ácido siálico (Walz *et al.*, 2005); 2) unión de la adhesina bacteriana BabA a residuos de fucosa: caseína (Strömqvist *et al.*, 1995) y fucosa, que además se une al LPS de la bacteria (Miszczyk *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2009).

Se promediaron los resultados de al menos tres experimentos, cada uno por cuadruplicado, y se realizó un análisis de varianza para saber los grupos con diferencia significativa respecto al control ($p \leq 0.05$).

6.9 Microscopía confocal.

Con el objetivo de observar cualitativamente el efecto de los extractos sobre la adherencia de *H. pylori*, se utilizó microscopía confocal. Se sembraron 1×10^6 células AGS en un cubreobjetos, 24 h después se añadieron 1×10^9 UFC de *H. pylori* marcadas con FITC (descrito en sección 6.8) y 10 μ l de extracto (0.05, y 1 mg/ml). Tras 1 h de incubación, las células AGS se lavaron con PBS frío para eliminar las bacterias que no se adhirieron, después se fijaron con paraformaldehído 2% durante 10 min y se agregó yoduro de propidio incluido en medio de montaje VECTASHIELD[®], posteriormente se montaron en un portaobjetos y se observaron en un microscopio confocal Leica TCS SP5.

6.10 Fraccionamiento biodirigido del extracto DMPA.

Considerando tanto la actividad biológica como el rendimiento, se llevó a cabo el fraccionamiento del extracto DMPA biodirigido por la actividad antiadherente. El proceso se describe a continuación.

6.10.1 Obtención a mayor escala del extracto DMPA.

Se obtuvo un nuevo extracto mediante el método de extracción exhaustiva por maceración. Se empleó 1 kg de partes aéreas seco y finamente molido. El proceso de extracción se llevó a cabo por maceración durante 72 h en 8 L de diclorometano-metanol 1:1 repitiendo la maniobra cuatro veces con el mismo material vegetal. Posteriormente, el solvente fue eliminado en un evaporador rotatorio *in vacuo* para determinar su peso seco y rendimiento.

6.10.2 Fraccionamiento primario del extracto DMPA.

Una vez que el extracto DMPA se secó por completo, se adsorbió en 75 g de gel de sílice y se fraccionó mediante cromatografía en columna abierta (CCA), la cual contenía 570 g de gel de sílice. Se emplearon sistemas de elución con mezclas de disolventes orgánicos de polaridad creciente. En el cuadro 1 se

resumen los sistemas de elución. Este procedimiento generó 324 subfracciones, las cuales fueron concentradas *in vacuo* para eliminar el disolvente y agrupadas en 15 fracciones primarias (nomenclatura 1→15) de acuerdo a su similitud cromatográfica monitoreada en CCF empleando placas de aluminio recubiertas con gel de sílice (sílica gel 60 F254, Merck) (Fig. 9)

Cuadro 1. Fraccionamiento primario del extracto DMPA de *P. hysterophorus*.

Extracto o Fracción	Subfracciones	Sistema de elución (disolventes y proporción)
DMPA		DM 1:1
1	1-17	H 1-HD 9:1
2	18-27	HD 9:1
3	28-45	HD 9:1- HD 8:2
4	46-60	HD 8:2- HD 7:3
5	61-78	HD 7:3- HD 6:4
6	79-94	HD 6:4
7	95-144	HD 6:4 –HD 4:6
8	145-174	HD 3:7
9	175-210	HD 2:8- HD 1:9
10	211-256	D 1- DM 9:1
11	257-262	DM 9:1- DM 8:2
12	263-274	DM 8:2- DM 7:3
13	275-306	DM 7:3- DM 6:4
14	307-318	DM 1:1
15	319-324	M 1

H= hexano, D= diclorometano, M= metanol

6.10.3 Fraccionamiento secundario del extracto DMPA

La fracción 6 se eligió debido a su alta actividad biológica, rendimiento y baja complejidad aparente. Tres gramos de la fracción 6 se adsorbieron en 8.5 g de gel de sílice y se sometieron a CCA, que contenía 569 g de gel de sílice (de los cuales 427 g fueron previamente rociados con agua y secados). Se emplearon sistemas de elución con mezclas de disolventes orgánicos de polaridad creciente. En el cuadro 2 se resumen los sistemas de elución. Se generaron 296 subfracciones que se agruparon en 15 fracciones secundarias (nomenclatura 6.1→6.15) de acuerdo a su similitud cromatográfica monitoreada en CCF (Fig. 9).

Cuadro 2. Fraccionamiento secundario del extracto DMPA de *P. hysterophorus*.

Extracto o Fracción	Subfracciones	Sistema de elución (disolventes y proporción)
6		HD 6:4
6.1	1-9	HD 1:1
6.2	10-15	HD 4:6
6.3	16-19	HD 4:6- HD 3:7
6.4	20-25	HD 3:7
6.5	26-92	HD 3:7- HD 1:9-D 1
6.6	93-113	D 1- DM 99:1
6.7	114-139	DM 99:1
6.8	140-169	DM 99:1- DM 98:2
6.9	170-177	DM 98:2
6.10	178-188	DM 98:2- DM 97:3
6.11	189-246	DM 97:3- DM 8:2

Fracción	Subfracciones	Sistema de elución (disolventes y proporción)
6.12	247-249	DM 8:2
6.13	250-260	DM 8:2- DM 7:3
6.14	261-288	DM 7:3- DM 1:1
6.15	288-296	DM 1:1-M 1

H= hexano, D= diclorometano, M= metanol

6.10.4 Aislamiento e identificación de partenina y coronopilina

De las subfracciones 16 y 17 precipitó naturalmente un compuesto cristalino e incoloro (nomenclatura PART) que se analizó por resonancia magnética nuclear de protón (RMN-¹H) y de carbono-13 (RMN-¹³C) en un aparato Bruker BioSpin GmbH a una frecuencia de 400 y 100 MHz respectivamente, a 25 °C. Los espectros se generaron en CDCl₃, utilizando tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Este análisis se llevó a cabo en el Laboratorio de Servicios Analíticos del Instituto de Química de la UNAM con apoyo de la Dra. Martha L. Macías Rubalcava.

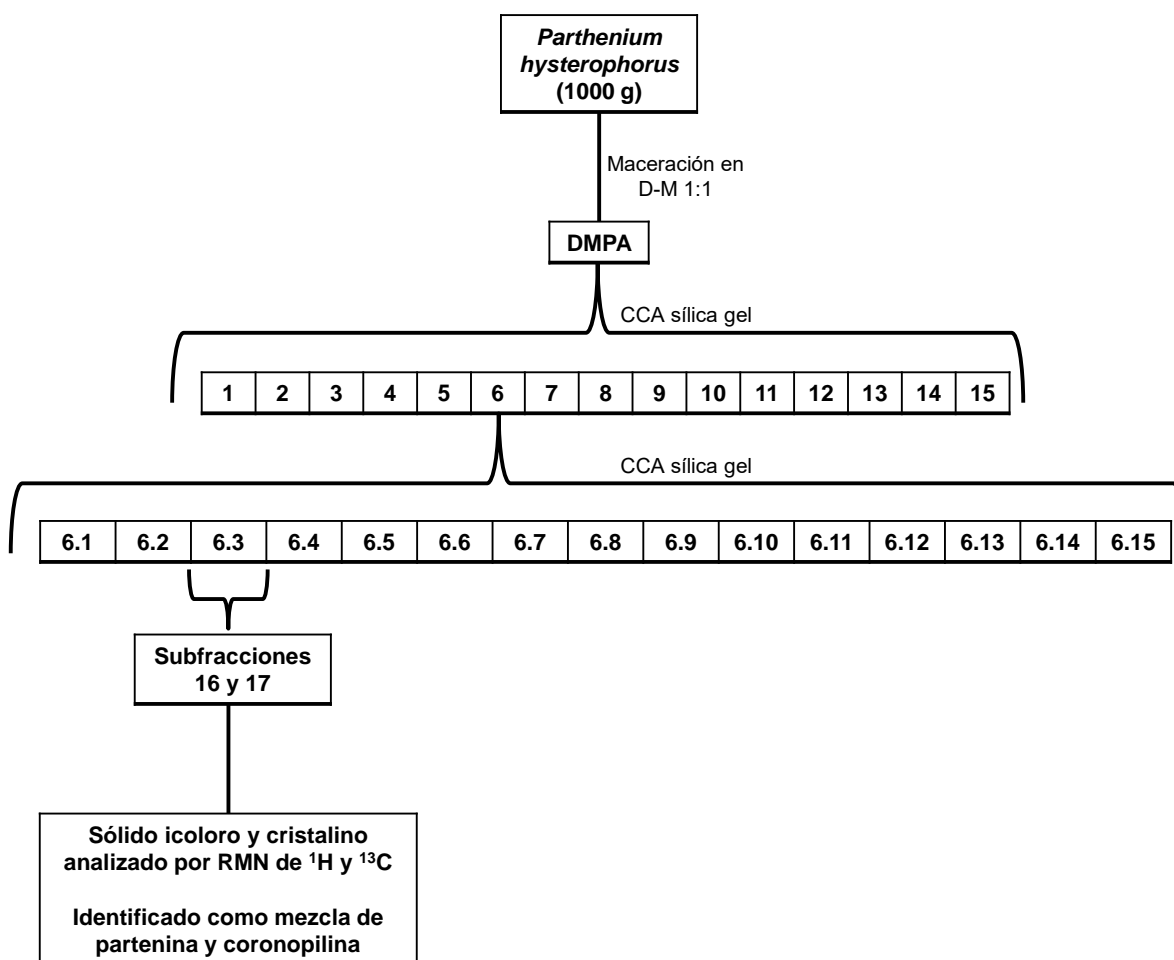


Figura 9. Elaboración y fraccionamiento de extracto DMPA. CCA: cromatografía en columna abierta.

6.11 Efecto de compuestos puros sobre la adherencia de *H. pylori*.

Dado que la fitoquímica de *P. hysterophorus* ha sido ampliamente estudiada, se evaluó el efecto antiadherente de: quercetina, estigmasterol, ácido ursólico (SIGMA), β -sitosterol, ácido caféico, ácido vainillínico (amablemente donados por el Dr. Guillermo Delgado Lamas), histerina y partenina (amablemente donados por el Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo), compuestos cuya presencia se ha detectado en *P. hysterophorus*.

6.12 Mecanismo de acción de la actividad antiadherente del extracto DMPA.

H. pylori tiene diversas adhesinas para unirse a las células gástricas, para estudiarlas se emplean compuestos que bloquean la adherencia a través de su

unión con algunas de ellas, por ello, se puede determinar si el efecto del tratamiento experimental se relaciona con alguno de sus mecanismos.

Dos de las más estudiadas y mejor caracterizadas son: SabA, que se une a través de su interacción con ácido siálico a compuestos sialilados como Lewis X; y BabA, que se une a la fucosa de oligosacáridos fucosilados, como Lewis B (Walz, *et al.*, 2005).

Para entender el mecanismo a través del cual el extracto DMPA inhibe la adherencia, se evaluó la adherencia de las bacterias mediante su cuantificación descrita en la sección 6.8 tras la preincubación de *H. pylori* o células AGS con DMPA en combinación con ácido siálico y fucosa.

6.13 Evaluación de la citotoxicidad de los extractos.

Se midió la viabilidad celular tras la incubación de células AGS en presencia o ausencia de los extractos mediante un ensayo colorimétrico. Este ensayo se basa en la reducción metabólica de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2, 5-difeniltetrazol (MTT) a un compuesto color violeta llamado formazán, realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa (Mossman, 1983).

Inicialmente se sembraron 1×10^9 células AGS/pozo en una placa de 24 pozos con 2 ml de D-MEM y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ para permitir la formación de la monocapa celular. Transcurrido el tiempo, se lavaron con PBS, se añadieron 10 µl de tratamiento (0-1000 µg/ml) y se incubaron por 1 h o 24 h a 37°C y 5% de CO₂. Después, las células se lavaron con 500 µl de PBS para eliminar los residuos de extracto y se añadieron 50 µl de MTT (5 mg/ml), 2 horas después de incubarlas, se retiró el medio de cultivo y se añadieron 300 µl de DMSO para disolver los cristales de formazán. Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm.

El porcentaje de viabilidad se obtiene con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad} = (A_{570} \text{ células tratadas} \times 100) / (A_{570} \text{ células control})$$

Se promediaron los resultados de al menos dos experimentos, cada uno por triplicado, y se realizó un análisis de varianza para saber los grupos con diferencia significativa respecto al control ($p \leq 0.05$).

6.14 Evaluación de la resistencia eléctrica transepitelial.

Se evaluó la integridad de la monocapa de células mediante la cuantificación de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER). Se utilizaron dos líneas celulares, AGS y LLC-PK1, ya que éstas últimas forman uniones estrechas estables.

Para la medición de la TEER se sembraron células en insertos Transwell® de 24 mm de diámetro que poseen una membrana de 0.4 μm , mismos que se colocaron en una placa de seis pozos. Estos insertos permiten diferenciar el medio del compartimento apical y el del compartimento basolateral.

Se utilizó un voltímetro EVOM (Epithelial Tissue Voltohmmeter; World Precision Instruments) el cual tiene dos electrodos, que se sitúan en cada uno de los compartimentos y son separados por la monocapa celular. Se aplicó una intensidad de corriente de 10 μA , el aparato mide el voltaje resultante. Basado en la ley de Ohm, el aparato calcula la resistencia en ohms (Fig 10).

Se sembraron 1×10^6 células por inserto y se incubaron durante 4 días a 37°C y 5% de CO_2 para permitir la formación de la monocapa celular y la estabilización de la TEER. El 5º día se lavaron con PBS y se añadió medio fresco en ambos compartimentos. 1 h después se tomó la primera medida de TEER (0 h).

Posteriormente se agregaron 0.5 mg/ml de extracto DMPA en la cámara apical y se midió la TEER 1, 3, 6 y 12 h después. Cada tiempo de tratamiento se realizó por triplicado y se hicieron cuatro lecturas por pozo.

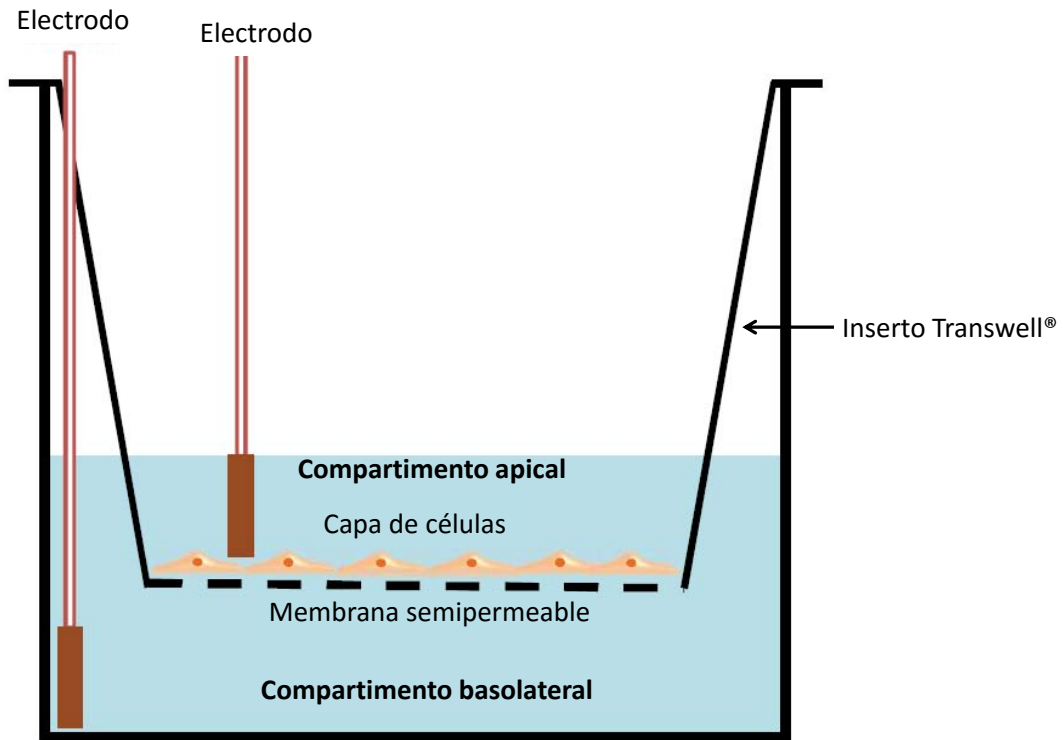


Figura 10. Esquema de la medida de la resistencia eléctrica transepitelial.
Modificado de Srinivasan *et al.*, 2015.

7. Resultados y Discusión

7.1 Extractos de *P. hysterothorus*.

P. hysterothorus es una planta ampliamente usada en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales. La información etnobotánica también señala que la decocción de las raíces se emplea en el tratamiento de la gastritis. Con el objetivo de obtener la mayor información posible acerca de los compuestos que pudieran ser activos, se prepararon extractos tanto de raíz como de partes aéreas con solventes de distinta polaridad.

Se obtuvieron 10 extractos los cuales fueron denominados de acuerdo al solvente en el que fueron preparados y la parte de la planta utilizada. Los nombres de los extractos, así como el solvente utilizado y el rendimiento obtenido de cada uno se señalan en el cuadro 3.

Los extractos de partes aéreas presentaron mayor rendimiento que los de raíz, asimismo, los extractos polares generaron mayores rendimientos, en especial DMPA y APA (Cuadro 3).

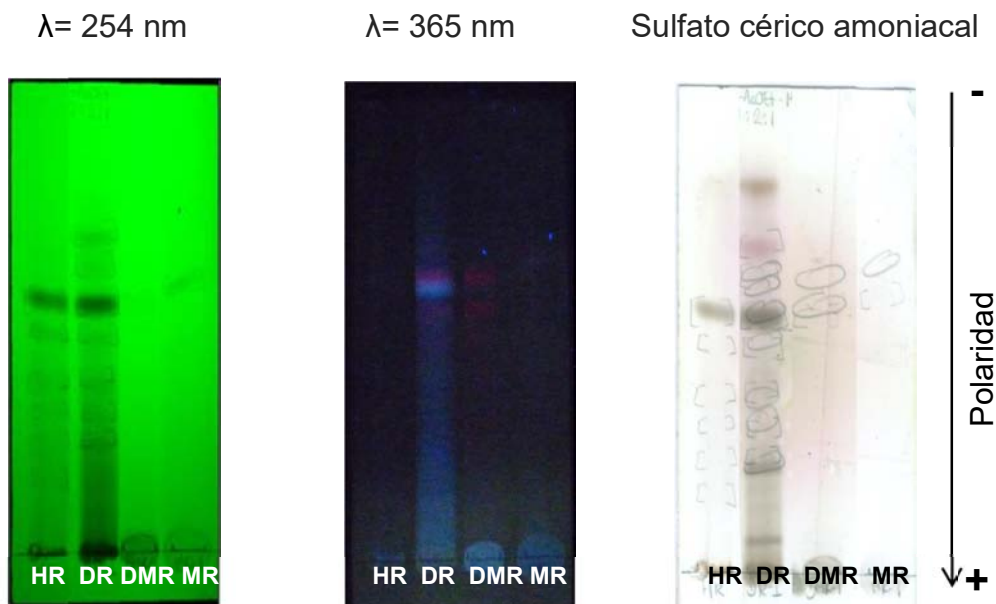
En la figura 11 se muestran los perfiles cromatográficos de los extractos orgánicos. Se observa que los extractos diclorometánicos y hexánicos son similares entre sí, asimismo, los extractos diclorometano-metanólicos y metanólicos.

Cuadro 3. Rendimiento y denominación de los extractos.

RAÍZ				PARTES AÉREAS			
Solvente	EXTRACTO	Peso seco (mg)*	Rendimiento %	Solvente	EXTRACTO	Peso seco (mg)*	Rendimiento %
Hexano	HR	163.0	0.41	Hexano	HPA	437.6	1.09
Diclorometano	DR	241.5	0.60	Diclorometano	DPA	1617.1	4.04
Diclorometano-metanol 1:1	DMR	1769.7	4.42	Diclorometano-metanol 1:1	DMPA	3248.6	8.12
Metanol	MR	1499.1	3.75	Metanol	MPA	1954.1	4.89
Agua	AR	1728.3	4.32	Agua	APA	3543.2	8.85

*mg de extracto obtenido a partir de 40 g de material vegetal.

a) Raíz



b) Partes aéreas

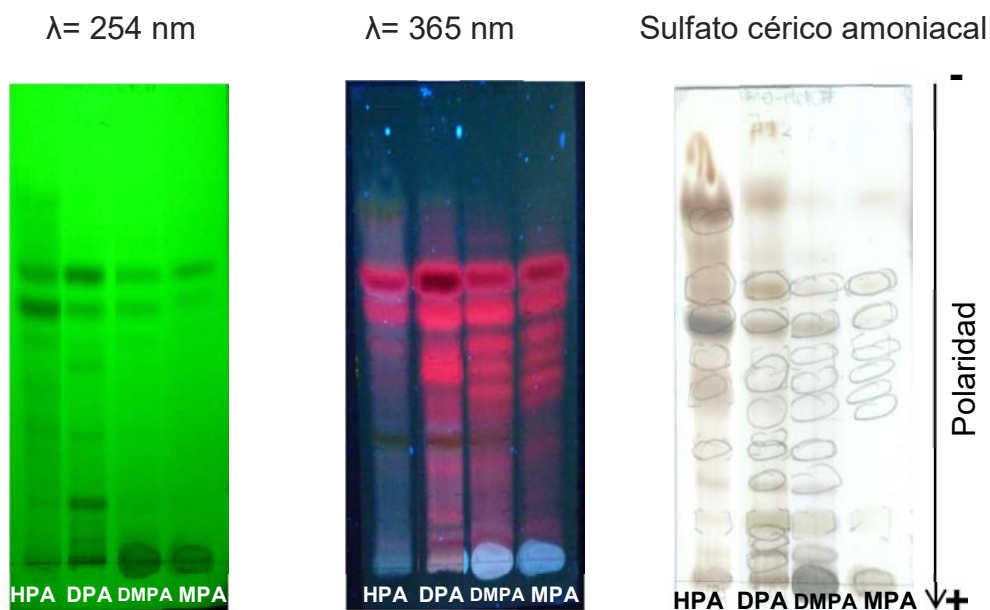


Figura 11. Perfil metabólico de los extractos orgánicos de *P. hysterophorus*. a) raíz, b) partes aéreas. Cromatografía en capa fina (CCF). Fase móvil: 7 Hexano: 2 Acetato de etilo: 1 Metanol. (H= extracto hexánico, D= extracto diclorometánico, DM= extracto diclorometano-metanólico, M= extracto metanólico, A= extracto acuoso). En la parte superior de cada cromatograma se indica el revelador utilizado.

Si bien el objetivo de este proyecto fue estudiar el efecto de los extractos de *P. hysterophorus* sobre los mecanismos de colonización de *H. pylori*, también se evaluó su potencial anti-*H. pylori*, ampliando con ello la información etnofarmacológica de la especie. Asimismo, esta información fue fundamental para elegir las concentraciones adecuadas a evaluar en este trabajo.

7.2 Evaluación de la actividad anti-*H. pylori*.

Se determinó la actividad anti-*H. pylori in vitro* mediante el método de dilución en cultivo líquido. En la figura 12 se muestra la actividad anti-*H. pylori* de cada uno de los extractos, en función del porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano al incrementar la concentración y en el cuadro 4, sus CMI.

Los extractos HR, DR y DMPA presentaron una CMI= 31.3 µg/ml, mientras que DMR, HPA y DMPA una CMI= 62.5 µg/ml que dentro de la clasificación de Castillo y cols. representa una buena actividad (Castillo *et. al.*, 2009). Asimismo, estos extractos tuvieron una CMI considerablemente mayor a la de la amoxicilina (0.05 µg/ml) y a la de la claritromicina (0.5 µg/ml), pero menor a la del metronidazol (CMI= 200 µg/ml), uno de los fármacos más utilizados contra *H. pylori*. Esto los convierte en una fuente promisorio de compuestos anti-*H.pylori* que, con mayor investigación farmacológica, podrían ser empleados en los tratamientos de gastritis. Por otro lado, los extractos polares tuvieron menor actividad, tanto MR como MPA presentaron una actividad moderada (CMI= 125 µg/ml) y los extractos AR y APA solo inhibieron parcialmente el crecimiento de la bacteria, sin llegar a inhibir por completo el crecimiento.

Hay que hacer notar que los extractos orgánicos inhiben más del 100% de crecimiento bacteriano, esto indica que se detectaron menos bacterias que en la medición inicial, por tanto, sabemos que los extractos tienen efecto bactericida.

El hecho de encontrar extractos activos de diferentes polaridades indica la diversidad estructural de los compuestos efectivos contra la bacteria.

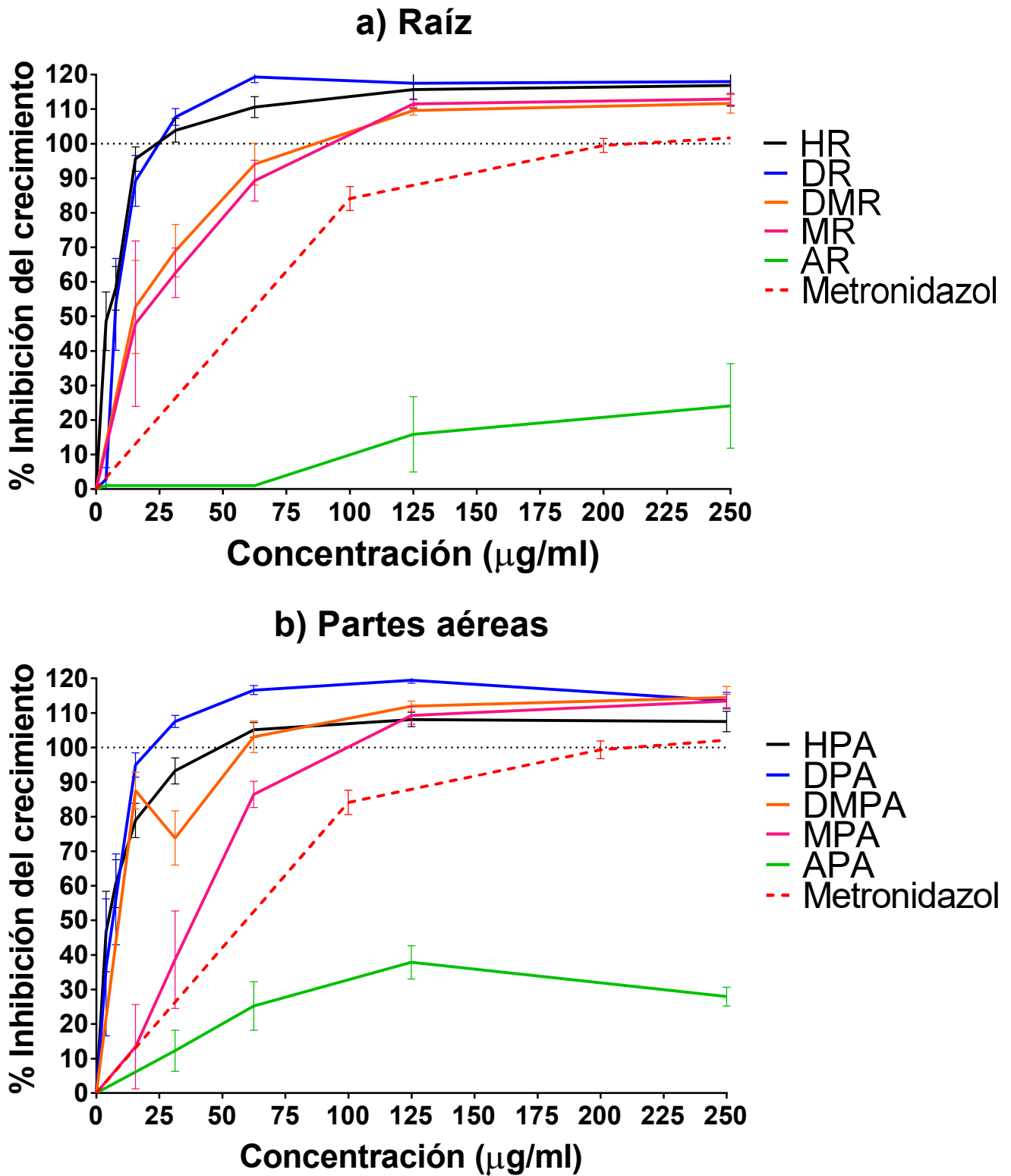


Figura 12. Actividad anti-*H. pylori* de los extractos de *P. hysterophorus* y de metronidazol. a) Raíz b) Partes aéreas. (H= extracto hexánico, D= extracto diclorometánico, DM= extracto diclorometano-metanólico, M= extracto metanólico, A= extracto acuoso). Cada curva representa el promedio de al menos tres réplicas independientes por triplicado.

Cuadro 4. CMI de los extractos y antibióticos de referencia.

Raíz		Partes aéreas	
Extracto	CMI (µg/ml)	Extracto	CMI (µg/ml)
HR	31.3	HPA	62.5
DR	31.3	DPA	31.3
DMR	62.5	DMPA	62.5
MR	125	MPA	125
AR	>250	APA	>250
Antibióticos			
Amoxicilina		0.05	
Claritromicina		<0.5	
Metronidazol		200	

7.3 Efecto de los extractos sobre los mecanismos de colonización de *H. pylori*.

7.3.1 Efecto de los extractos sobre la motilidad de *H. pylori in vitro*.

Una vez determinada la CMI de los extractos, se evaluó su efecto sobre la motilidad de *H. pylori*. El movimiento de la bacteria es un mecanismo fundamental para que esta recorra el tracto digestivo a través de las capas de moco y pueda adherirse a las células gástricas. La inhibición de la motilidad podría disminuir la tasa de infección por *H. pylori* y de esta manera explicar el efecto etnobiológico que se evaluó en este estudio.

Para determinar el efecto de los extractos sobre la motilidad se incubó *H. pylori* durante 7 días en placas de agar suave en presencia o ausencia de los extractos y se consideró la CMI de cada uno como la concentración más alta a

evaluar. En ausencia de los extractos, se observó un halo de motilidad alrededor del punto de siembra (Fig. 13a). En presencia de los extractos hubo una disminución significativa del área del halo (Fig. 13b)

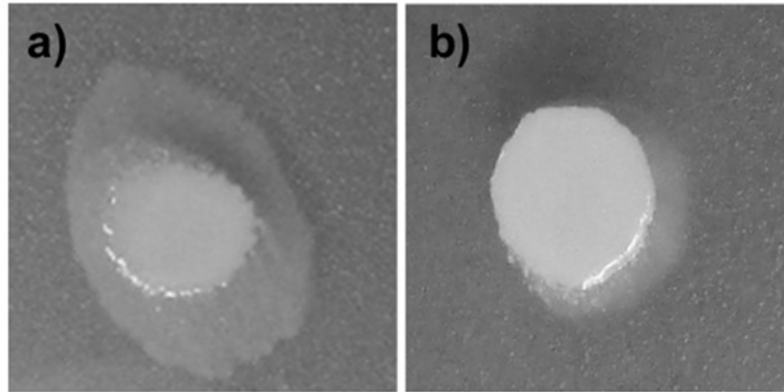


Figura 13. Imágenes representativas de los halos de motilidad de *H. pylori* en placas de agar suave. a) control negativo b) con extracto.

En la figura 14 se muestra el porcentaje de inhibición de la motilidad de cada uno de los extractos a la CMI y a concentraciones menores, exceptuando algunos casos, donde el material vegetal era limitado y se evaluó desde el 50% de la CMI.

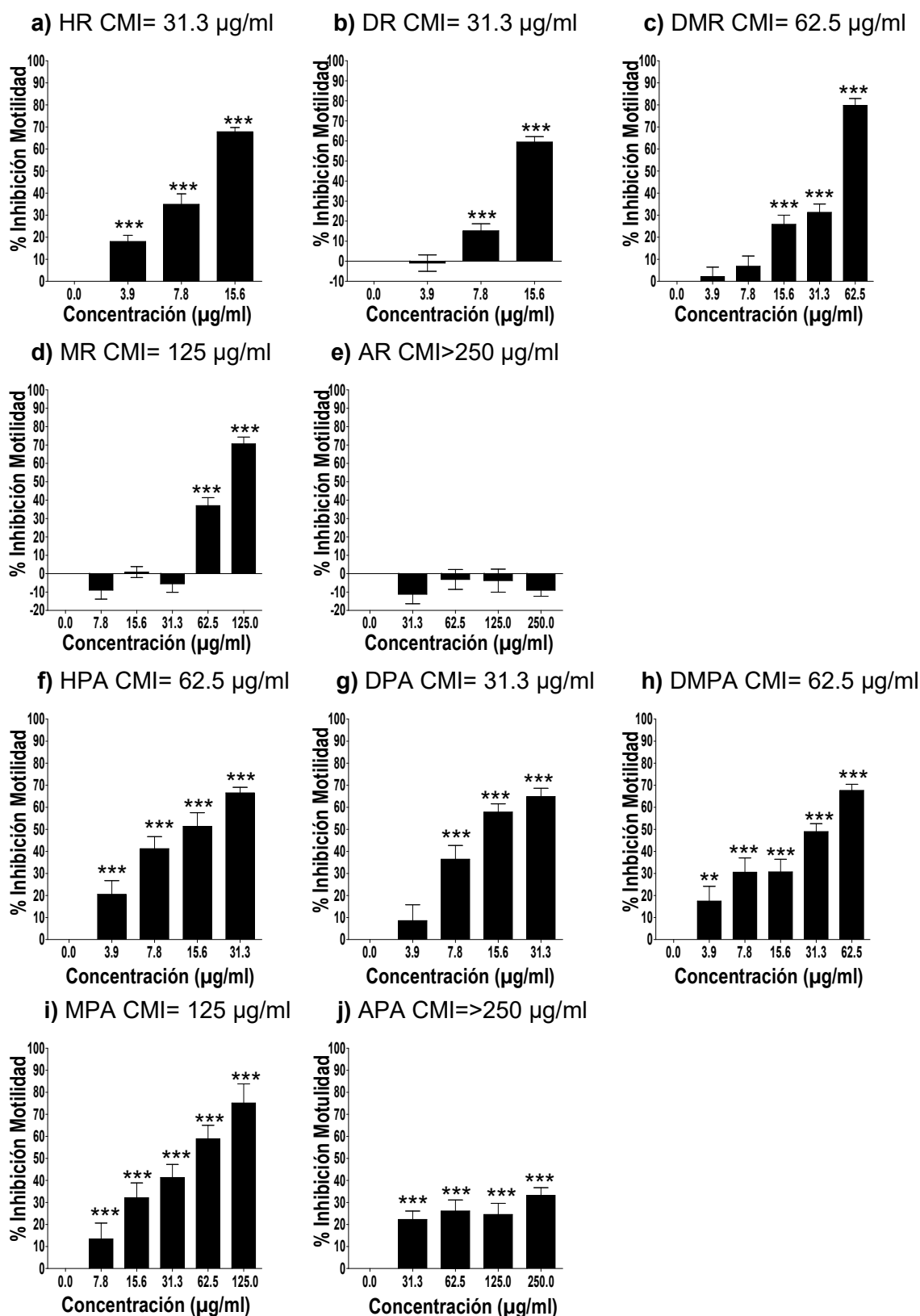


Figura 14. Efecto de los extractos de *P. hysterophorus* sobre la motilidad de *H. pylori*. a-e: extractos de raíz, f-j: extractos de partes aéreas. (H= extracto hexánico, D= extracto diclorometánico, DM= extracto diclorometano-metanólico, M= extracto metanólico, A= extracto acuoso). Cada barra representa el promedio de tres réplicas independientes por nonuplicado \pm error estándar de la media. Análisis de varianza de dos vías, postanálisis de Bonferroni para comparación múltiple de medias. Las diferencias estadísticas se determinaron con respecto al control negativo. *** $p < 0.001$.

La mayoría de los extractos inhibieron significativamente la motilidad bacteriana de manera concentración dependiente con un efecto máximo de entre 60 y 80%. No obstante, el AR no presentó actividad y el APA inhibió significativamente entre 20 y 30% independientemente de la concentración. La inhibición de la motilidad se relaciona con la actividad anti-*H. pylori* de cada extracto, aunque a las CMI hubo entre el 20 y 40% de motilidad. El hecho de que a la CMI se inhiba el 100% de crecimiento bacteriano en el ensayo anti-*H. pylori* y en el de motilidad se detecte halo, se puede deber a la diferencias entre ambos ensayos: 1) la disponibilidad del extracto en medio líquido (actividad anti-*H. pylori*), donde los compuestos están disueltos en el medio y en agitación constante durante la incubación, permitiendo que un gran porcentaje de ellos tenga contacto con las bacterias; mientras que en el medio sólido (motilidad) una vez que los extractos se disolvieron en el medio, sólo la suma de compuestos presentes en la zona donde crece la bacteria tienen contacto con ella, y 2) el tiempo, el periodo de incubación en el ensayo de la actividad anti-*H. pylori* es de 24 h y en el ensayo de motilidad es de 7 días, donde puede haber descomposición de los compuestos antibacterianos, permitiendo el crecimiento aun a la CMI.

Es difícil comparar el efecto sobre la motilidad de estos extractos con el de otros productos naturales, ya que hay pocos reportes al respecto. Un ejemplo es el siringaresinol, un lignano aislado de *Prunus mume*, una ciruela de origen chino; este compuesto inhibe el 50% de la motilidad de *H. pylori* con 50 µg/ml y el 90% con 500 µg/ml (Miyazawa *et al.*, 2006). La mayoría de los extractos de *P. hysterothorus* son más potentes que el siringaresinol porque inhibieron el 50% de la motilidad con la mitad o menos de la concentración requerida por este compuesto, incluso los extractos HR, DMR, HPA y DMPA inhibieron 70-80% con 8 o 16 veces menos cantidad que la que requirió el siringaresinol para inhibir el 90%. Este compuesto ya se ha aislado previamente de *P. hysterothorus* (Das *et al.*, 1999), por lo que es probable que contribuya en la inhibición de la motilidad en los extractos polares (metanólicos y acuosos), pero es necesario verificar y cuantificar su presencia en estos.

7.3.2 Efecto de los extractos sobre la actividad de la ureasa de *H. pylori* in vitro.

La actividad de la enzima ureasa es fundamental para el éxito en la colonización de *H. pylori*. La ureasa neutraliza el microambiente de la bacteria mediante la hidrólisis de urea, produciendo amonio y dióxido de carbono; esta reacción aumenta el pH y este incremento cambia la viscoelasticidad de la capa mucosa del estómago, facilitando a su vez la motilidad (Celli *et al.*, 2009). Conjuntamente, la ureasa genera un gradiente de H^+ que puede ser usado por el flagelo (Yoshiyama and Nakazawa, 2000). Por lo que la inhibición de esta enzima podría disminuir considerablemente la tasa de infección.

En este ensayo se evaluó el efecto de los extractos de *P. hysterophorus* para inhibir la ureasa. La actividad enzimática se midió colorimétricamente a través de la cuantificación de amonio liberado por la enzima tras ser incubada en presencia o ausencia de los extractos. Como se observa en la figura 15, la mayoría de los extractos inhibieron parcialmente a la enzima, independientemente de la concentración empleada. Sin embargo, el extracto DR tuvo la actividad más alta e inhibió de manera dependiente de la concentración, alcanzando el 74 % a 500 $\mu\text{g/ml}$; su IC_{50} fue 136.4 $\mu\text{g/ml}$. Si se compara DR con el control positivo AHA, cuyo IC_{50} fue 11.7 $\mu\text{g/ml}$, DR fue menos potente y ligeramente menos eficaz. No obstante, es probable que si se purifican los compuestos activos de DR podrían aumentar su potencia y eficacia.

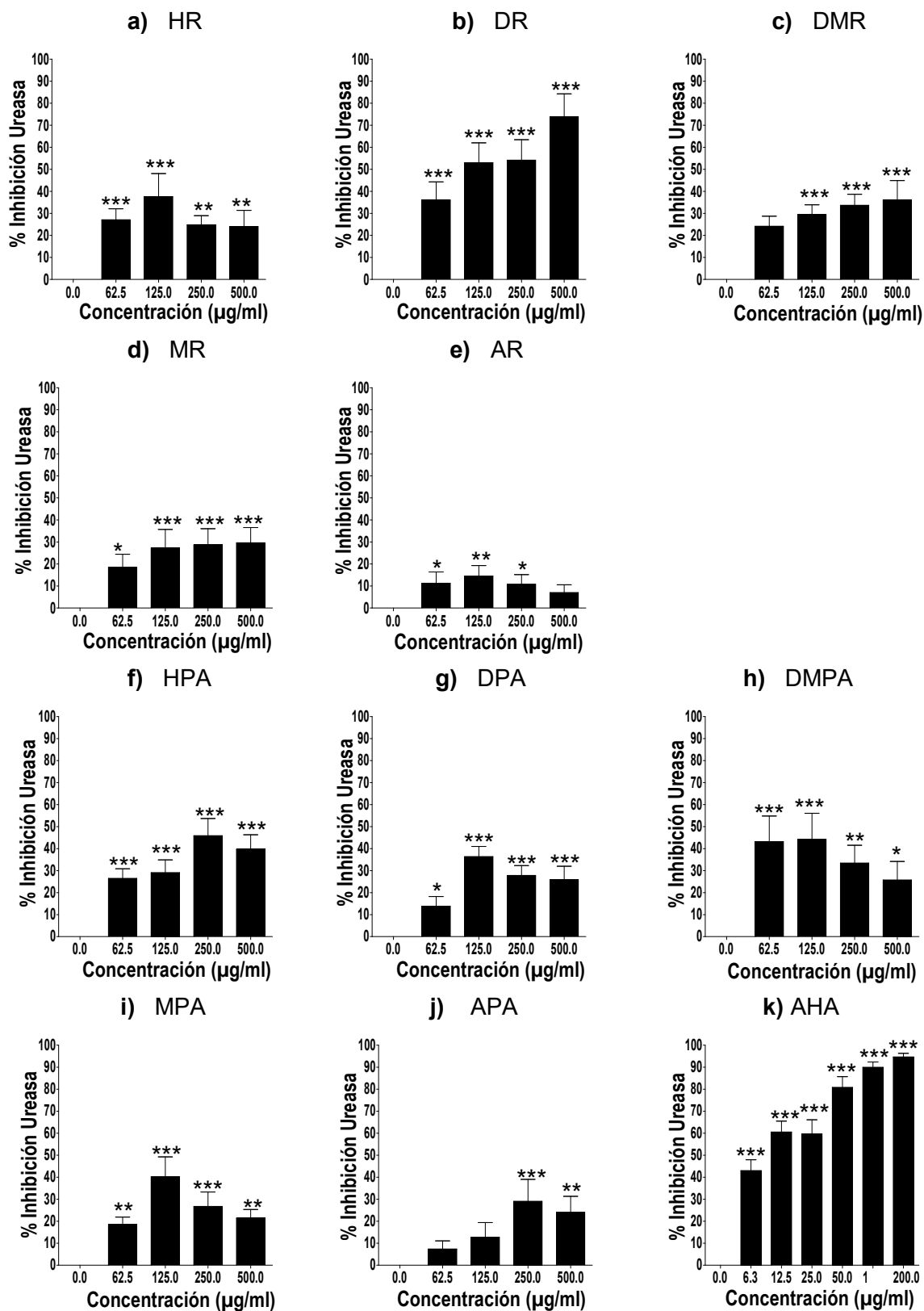


Figura 15. Efecto de los extractos de *P. hysterophorus* sobre la actividad de la ureasa de *H. pylori*. a-e: extractos de raíz, f-j: extractos de partes aéreas, k) ácido acetohidroxámico (control positivo). (H= extracto hexánico, D= extracto diclorometánico, DM= extracto diclorometano-metanólico, M= extracto metanólico, A= extracto acuoso). Cada barra representa el promedio de tres réplicas independientes por triplicado \pm error estándar de la media. Análisis de varianza de dos vías, postanálisis de Bonferroni para comparación múltiple de medias. Las diferencias estadísticas se determinaron con respecto al control negativo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

La inhibición de la actividad de la ureasa dada por los extractos de *P. hysterophorus* podría explicar la reducción de la motilidad bacteriana (Fig. 14) debido a que los protones generados por la enzima sirven como fuerza motriz del flagelo. De hecho, un flavonoide llamado sofalcona, que se utiliza como agente protector de mucosa en el tratamiento de la gastritis y úlceras, inhibe la motilidad de *H. pylori* a través de la inhibición de la ureasa (Yoshiyama *et al.*, 2000).

Un número considerable de productos naturales han sido evaluados como inhibidores de ureasa de *H. pylori*, en el caso de extractos vegetales se han reportado valores de IC₅₀ de entre 6.5 y 92 µg/ml y para el caso de compuestos puros valores de entre 4.8 y 200 µM (Modolo *et al.*, 2015). Comparado con estos productos naturales, el extracto DR fue menos eficaz, pero presentó mejor actividad que otros productos como algunas fracciones de miel que inhibieron entre el 42 y 51% de la actividad enzimática (Matongo y Nwodo, 2014) y tiene una actividad semejante al resveratrol, que inhibe entre el 30 y 90% a concentraciones similares a las del presente ensayo (Paulo *et al.*, 2011).

Dentro de ese contexto es importante recalcar que, si bien la inhibición de la ureasa disminuye la colonización de *H. pylori*, no es suficiente para eliminar la infección. Ejemplo de ello es un estudio donde se administró durante 10 días 750 mg de AHA a pacientes con úlcera doudenal y positivos a *H. pylori*, al final del tratamiento los pacientes presentaron los mismos niveles de ureasa, determinada con la prueba de aliento, que al inicio del mismo (El Nujumi *et al.*, 1991). Incluso se ha intentado transportar el AHA en lipoesferas hasta hacer contacto con las bacterias, resultando en una disminución de la tasa de infección *in vitro* (Umamaheshwari y Jain, 2004), o en esferas de policarbonato administradas a gerbos infectados, donde disminuyó significativamente el número de unidades formadoras de colonias pero no se erradicó por completo la infección (Umamaheshwari *et al.*, 2003).

En conclusión, la mayoría de los extractos de *P. hysterophorus* inhibieron parcialmente a la ureasa, pero en particular el extracto DR tuvo buena actividad en comparación con algunos otros productos naturales, que lo convierte en una

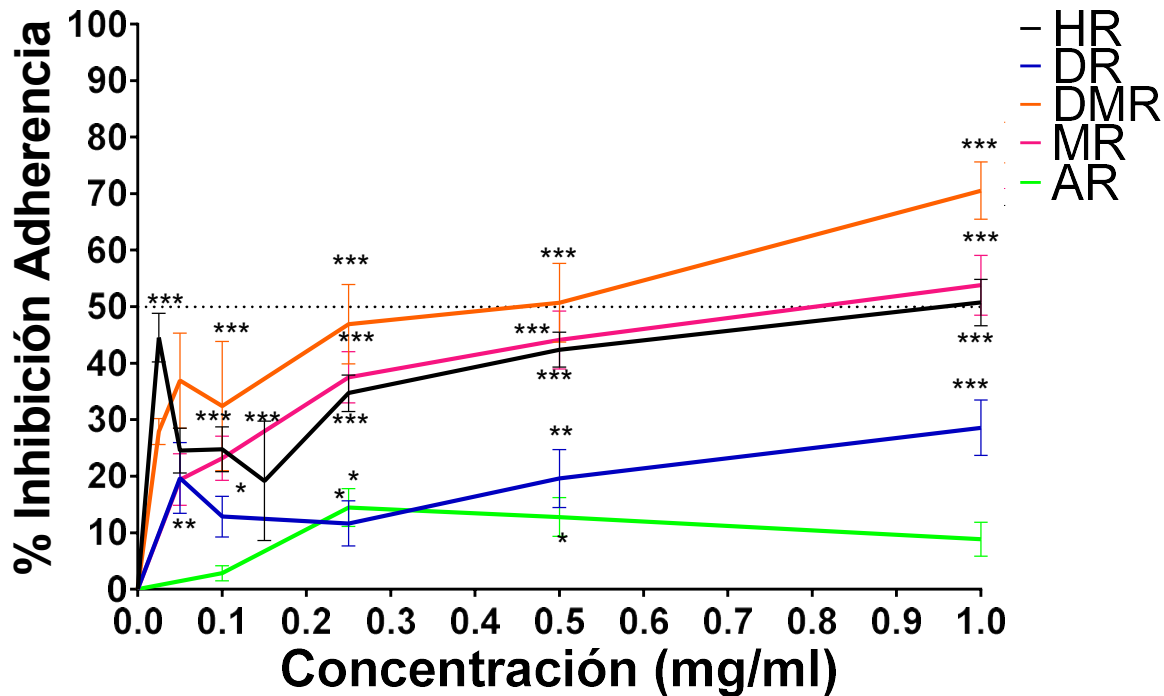
fuentes potenciales de compuestos inhibidores de ureasa y le da a la planta el potencial como tratamiento de la gastritis causada por *H. pylori*.

7.3.3 Efecto de los extractos sobre la adherencia de *H. pylori* in vitro.

La interacción bacteria-célula es sumamente importante para el establecimiento y éxito de la infección. Por ello, es importante buscar agentes que impidan o disminuyan este proceso. Para conocer el efecto de los extractos de *P. hysterophorus* sobre la adherencia de *H. pylori* se utilizaron células AGS y se realizó un ensayo fluorométrico.

El porcentaje de inhibición de la adherencia a distintas concentraciones de los extractos se observa en la figura 16. Se pueden distinguir dos grupos con base en su porcentaje máximo de inhibición. En los extractos de raíz (Fig. 16a), el grupo de baja actividad (<50% de inhibición) está compuesto por AR y DR; mientras que el grupo de alta actividad ($\geq 50\%$) por HR, DMR y MR. En los extractos de partes aéreas (Fig. 16b), la mayoría de los extractos presentaron baja actividad, excepto el extracto DMPA. Ambos extractos de DM inhibieron de una manera dependiente de la concentración, alcanzando el 70% de inhibición a 1 mg/ml. De manera notable, el extracto DMPA fue más efectivo que DMR porque inhibió el 45% desde 0.1 mg/ml. Se evaluaron 4 compuestos como controles positivos: fetuina y ácido siálico, que inhiben la adherencia bloqueando la unión de SabA a ácido siálico (Kobayashi *et al.*, 1993; Walz *et al.*, 2005); y caseína y fucosa que inhiben a través de la unión de BabA a residuos de fucosa (Strömqvist *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2009). Como se observa en la figura 17, los 4 compuestos inhibieron parcialmente la adherencia.

a) Raíz



b) Partes aéreas

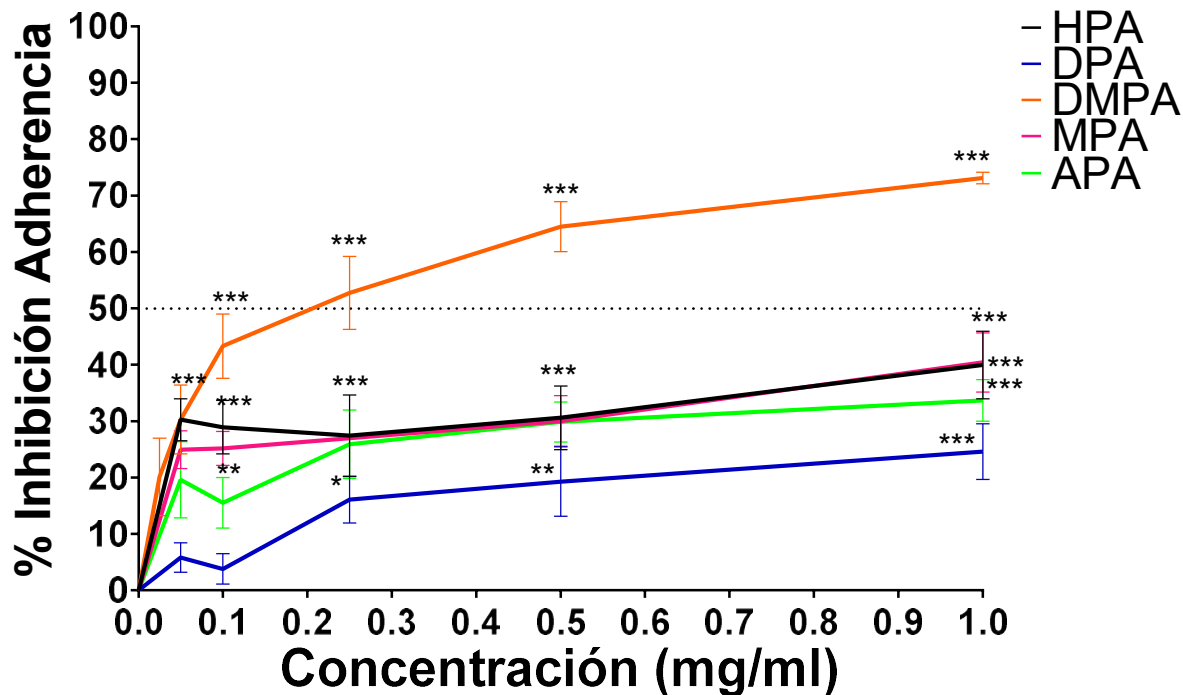


Figura 16. Efecto de los extractos de *P. hysterophorus* sobre la adherencia de *H. pylori* a células AGS. a) Raíz b) Partes aéreas. (H= extracto hexánico, D= extracto diclorometánico, DM= extracto diclorometano-metanólico, M= extracto metanólico, A= extracto acuoso). Cada curva representa el promedio de tres réplicas independientes por cuadruplicado \pm error estándar de la media. Análisis de varianza de dos vías, postanálisis de Bonferroni para comparación múltiple de medias. Las diferencias estadísticas se determinaron con respecto al control negativo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

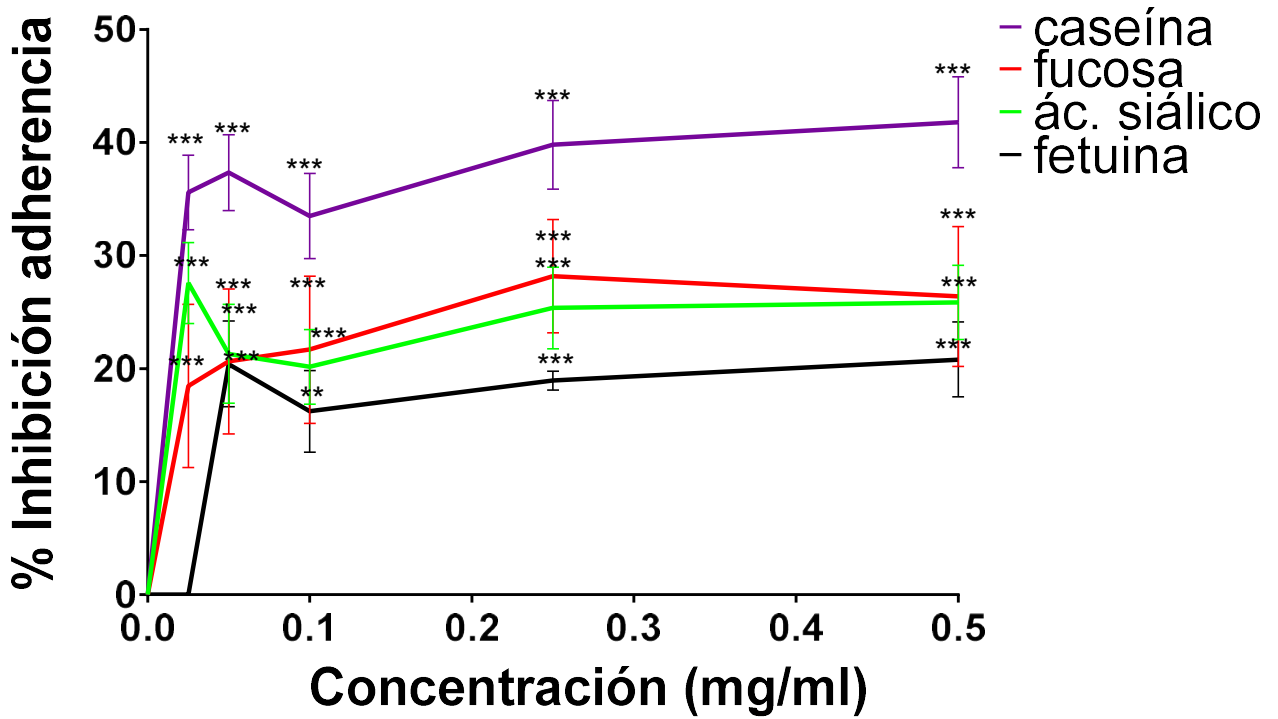


Figura 17. Efecto de controles positivos sobre la adherencia de *H. pylori* a células AGS. Cada curva representa el promedio de tres réplicas independientes por cuadruplicado \pm error estándar de la media. Análisis de varianza de dos vías, postanálisis de Bonferroni para comparación múltiple de medias. Las diferencias estadísticas se determinaron con respecto al control negativo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Con el fin de corroborar el efecto antiadherente de DMPA, se realizaron observaciones en el microscopio confocal. En la imagen del control negativo (Fig. 18a) se observa una gran cantidad de bacterias adheridas en el área de unión intercelular, patrón de adhesión previamente reportado (Costa *et al.*, 2013). Por el contrario, en los cultivos tratados con DMPA hubo una disminución progresiva de la adherencia (Fig. 18b-d).

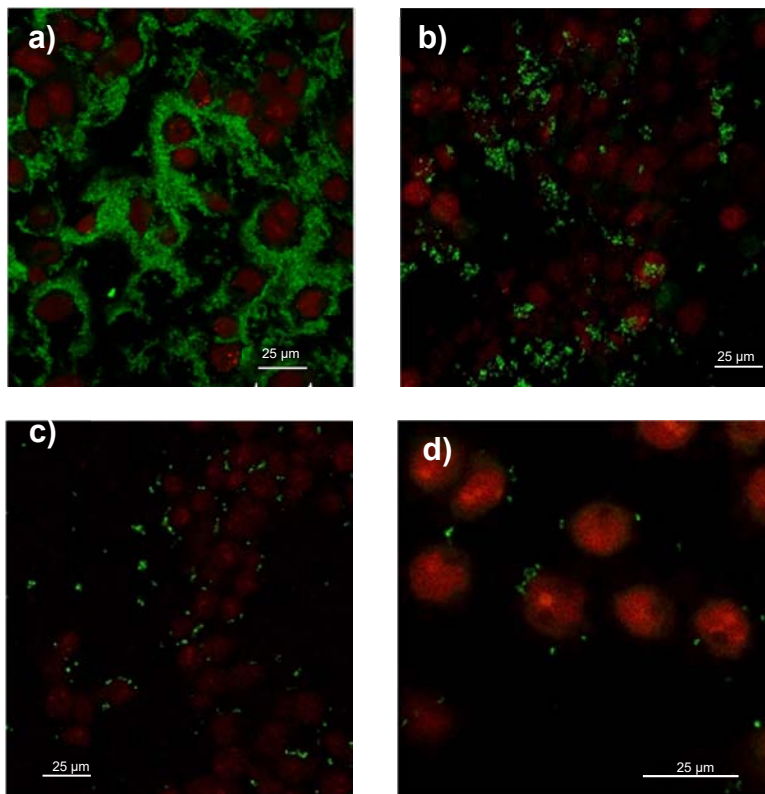


Figura 18. Imágenes representativas en microscopio confocal a una amplificación de 400X de la línea celular AGS (núcleo marcado con yoduro de propidio en rojo) cocultivada durante 1h con *H. pylori*-FITC (verde) y extracto DMPA a) 0 mg/ml. b) 0.05 mg/ml. c) 0.5 mg/ml. d) 1 mg/ml.

Se ha evaluado la actividad antiadherente de diversos productos naturales y generalmente inhiben la adherencia de manera parcial, por ejemplo, los extractos acuosos de *Curcuma longa*, *Borago officinalis* y *Petroselinum crispum* inhiben la adherencia de *H. pylori* a secciones histológicas de estómago en un 62%, 61% y 34%, respectivamente, a 0.05 mg/ml (O'Mahony *et al.*, 2005). Incluso al administrar altas concentraciones de tratamiento, la inhibición sigue siendo parcial, como en el caso del extracto de cáscara de manzana, el extracto acuoso de

Camellia sinensis y el extracto etanólico de *Pelargonium sidoides* (EPs® 7630), que inhibieron 80% (con 10 mg/ml), 60% (con 2 mg/ml) y 50% (con 1 mg/ml), respectivamente (Pastene *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2009; Beil and Kilian, 2007). No obstante, el extracto metanólico de *Phyllanthus urinaria* si inhibió la adherencia cerca del 100% con 0.125 mg/ml (Lai *et al.*, 2008).

Es poco probable que se logre inhibir por completo la adherencia, debido a la gran variedad de interacciones que existen entre las bacterias y las células del huésped. Ha sido bien caracterizado que algunas de esas interacciones están mediadas por carbohidratos en la superficie de ambas células, es por eso que se ha evaluado el efecto antiadherente de fracciones con alta concentración de polisacáridos. Por ejemplo, las fracciones de polisacáridos de *Panax ginseng* y *Artemisia capillaris* inhibieron el 66% y el 44%, respectivamente, con 2.8 mg/ml (Lee *et al.*, 2004) y las fracciones obtenidas de *Glycyrrhiza glabra* y *Aloe vera* inhibieron el 40% de la adherencia a 1 mg/ml (Wittschier *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2010). Comparado con estos productos naturales, los extractos DMR y DMPA presentaron una buena actividad, sin embargo, debido al rendimiento obtenido de cada uno (4.42% para DMR y 8.12% para DMPA), se continuó con el estudio del extracto DMPA con el fin de fraccionarlo y obtener los principios activos.

Los resultados generados hasta esta parte fueron publicados (Espinosa-Rivero *et al.*, 2015) (ver sección 11. Publicaciones).

7.4 Fraccionamiento biodirigido del extracto DMPA

Considerando que el extracto DMPA presentó la mejor actividad antiadherente (1 mg/ml =73% de inhibición) se preparó un nuevo extracto DMPA mediante maceración exhaustiva. Se obtuvieron 71.45 g. del nuevo extracto, el cual presentó un perfil metabólico muy similar y una actividad antiadherente sin diferencia significativa con respecto al primer extracto (Fig. 19).

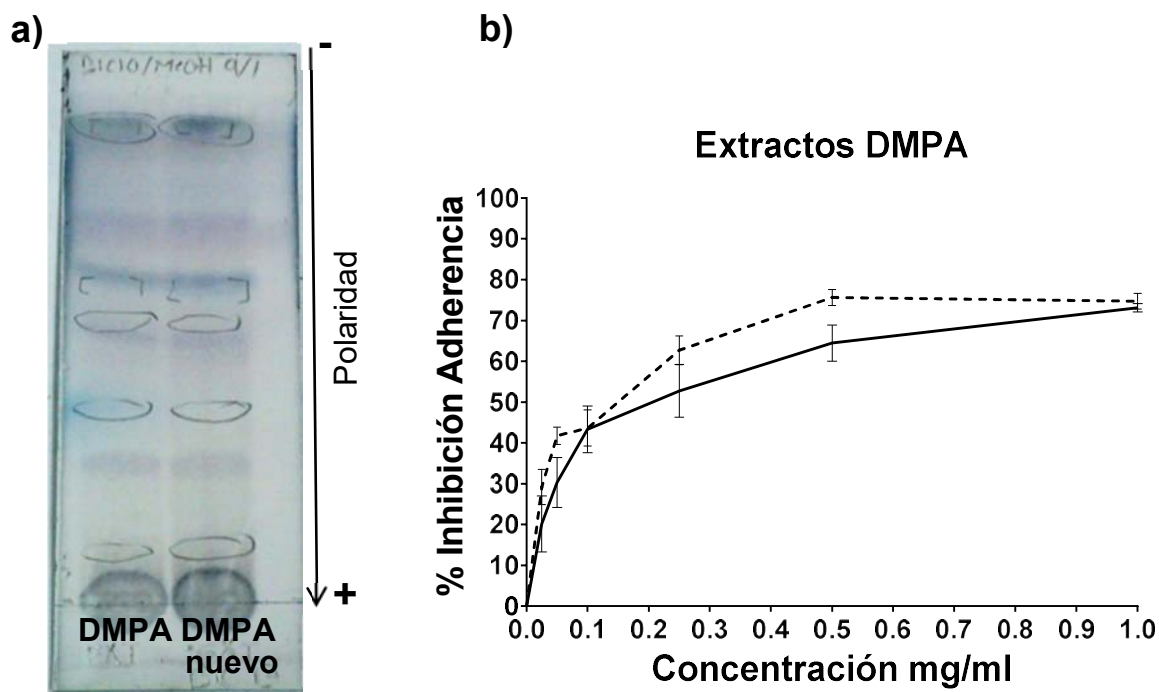


Figura 19. a) Perfil metabólico de los extractos DMPA de *P. hysterophorus*. Cromatografía en capa fina. Fase móvil: 9 Diclorometano: 1 Metanol. Revelada con vainillina sulfúrica. b) Efecto de los extractos DMPA de *P. hysterophorus* sobre la adherencia de *H. pylori* a células AGS. — DMPA - - - DMPA nuevo. Cada curva representa el promedio de tres réplicas independientes por cuadruplicado \pm error estándar de la media. Análisis de varianza de dos vías, postanálisis de Bonferroni para comparación múltiple de medias.

7.4.1 Fraccionamiento primario del extracto DMPA

Una vez que el extracto DMPA se secó por completo, se adsorbió en gel de sílice y se fraccionó mediante cromatografía en columna abierta (CCA) con diferentes sistemas de elución con polaridad creciente. Este procedimiento generó 324 subfracciones que se agruparon en 15 fracciones primarias (nomenclatura 1→15) de acuerdo a su similitud cromatográfica monitoreada en CCF (Cuadro 5). Como se observa en la figura 20, el fraccionamiento fue exitoso ya que el perfil metabólico de las fracciones difirió en cada una de ellas, obteniéndose compuestos más polares a lo largo del proceso. Los rendimientos de cada una de las fracciones se presentan también en el cuadro 5 obteniendo un rendimiento más alto en las fracciones 4 a 9, esto nos indica que la mayoría de los compuestos son de naturaleza no polar y de mediana polaridad.

Cuadro 5. Denominación, naturaleza y rendimiento de fracciones primarias de DMPA

Extracto o Fracción	Subfracción	Disolvente(s)	Peso* (mg)	Rendimiento** (%)
DMPA		DM 1:1	71450	100
1	1-17	H 1-HD 9:1	49.5	0.07
2	18-27	HD 9:1	18.4	0.03
3	28-45	HD 9:1- HD 8:2	829.8	1.16
4	46-60	HD 8:2- HD 7:3	10601.5	14.85
5	61-78	HD 7:3- HD 6:4	3763.2	5.26
6	79-94	HD 6:4	4266.4	6.06
7	95-144	HD 6:4 –HD 4:6	6981.8	9.80
8	145-174	HD 3:7	6699.4	9.38
9	175-210	HD 2:8- HD 1:9	5812.4	8.02
10	211-256	D 1- DM 9:1	1467.1	2.05
11	257-262	DM 9:1- DM 8:2	493.3	0.70
12	263-274	DM 8:2- DM 7:3	2781.0	3.90
13	275-306	DM 7:3- DM 6:4	4273.2	6.08
14	307-318	DM 1:1	709.3	1.00
15	319-324	M 1	438.2	0.61

*mg de fracción obtenida a partir de 71450 mg de extracto DMPA. **El valor del rendimiento está determinado a partir de la cantidad total de extracto DMPA.

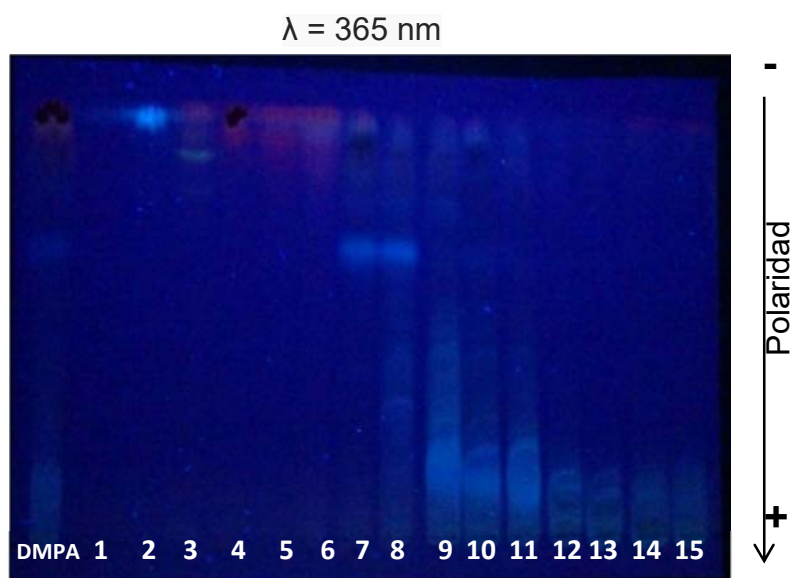
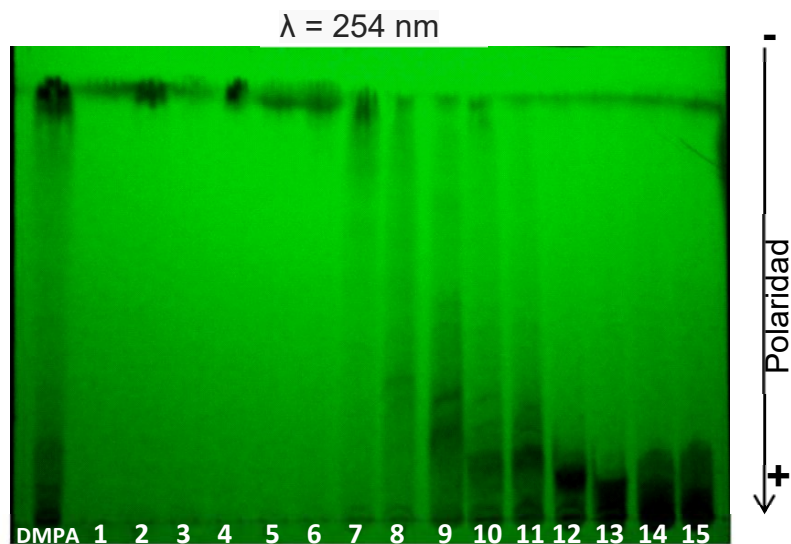


Figura 20. Perfil metabólico de las fracciones primarias de DMPA. Cromatografía en capa fina. Fase móvil: 7 Diclorometano: 3 Metanol. En la parte superior de cada cromatograma se indica el revelador utilizado.

Posteriormente se evaluó la actividad antiadherente de estas 15 fracciones (Cuadro 6).

Cuadro 6. Actividad anti-adherente de fracciones primarias de DMPA

Extracto o Fracción	Actividad anti-adherente (% Inhibición)	
	0.025 mg/ml	0.5 mg/ml
DMPA	29.2	75.6
1	36.8	38.4
2	41.5	36.0
3	51.5	63.6
4	63.2	83.6
5	45.4	50.0
6	55.7	80.4
7	72.7	75.6
8	51.4	66.7
9	46.0	71.4
10	50.0	72.6
11	68.0	80.2
12	69.8	72.3
13	57.4	72.7
14	59.3	75.2
15	67.9	71.8

Las fracciones 4, 6, 7 y 11 presentaron una actividad antiadherente alta, al inhibir entre el 55 y 72% con sólo 0.025 mg/ml y cerca del 80% con 0.5 mg/ml en contraste con el DMPA, que con 0.025 mg/ml inhibió el 29.2%. Esto indica un paso en la purificación de compuestos activos. Por otra parte, estas fracciones inhibieron como máximo el 80% de la adherencia a partir de 0.25 mg/ml (datos no mostrados), sugiriendo que los compuestos responsables de la inhibición han bloqueado por completo sus blancos. Asimismo, la variabilidad en cuanto a la polaridad de estas fracciones nos conduce a suponer la presencia de compuestos de polaridad distinta y por tanto con estructuras diversas (Fig 20).

Las fracciones 8-10 y 12-15 presentaron una actividad moderada-alta, mayor que DMPA a 0.025 mg/ml, sin embargo, a 0.5 mg/ml no rebasaron el 75.6% de inhibición obtenido con el extracto DMPA a la misma concentración (Cuadro 6).

Las fracciones 1 y 2 inhibieron a un nivel similar a DMPA a 0.025, sin embargo no lograron inhibir más del 40% y las fracciones 3 y 5 inhibieron más que DMPA a 0.025 mg/ml y alcanzaron un máximo de ~50-60% a 0.5 mg/ml (Cuadro 6). Estas fracciones también tienen compuestos inhibidores de la adherencia, pero no fueron candidatas para seguir el fraccionamiento.

7.4.2 Fraccionamiento secundario del extracto DMPA

Para continuar con el fraccionamiento secundario se eligió la fracción 6 debido a su alta actividad antiadherente (0.5 mg/ml = 80% inhibición) (Cuadro 6), alto rendimiento (6.06%) (Cuadro 5) y una menor complejidad metabólica respecto a las demás fracciones con alta actividad (4, 7 y 11) (Fig. 21).

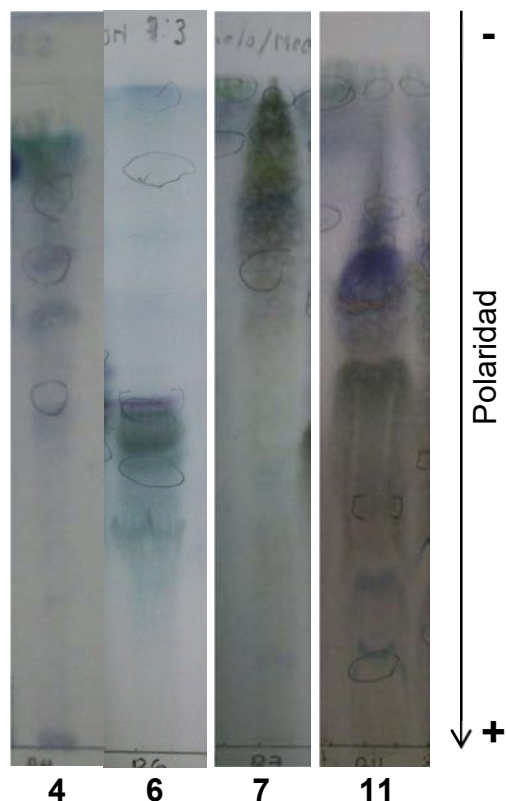


Figura 21. Perfil metabólico de las fracciones primarias de DMPA. Cromatografía en capa fina. a) 4 (fase móvil: 8 Diclorometano: 2 Metanol), b) 6 (fase móvil: 7 Diclorometano: 3 Metanol), c) 7 (fase móvil: 6 Diclorometano: 4 Metanol), d) 11 (fase móvil: 4 Diclorometano: 6 Metanol). Revelado con vainillina sulfúrica.

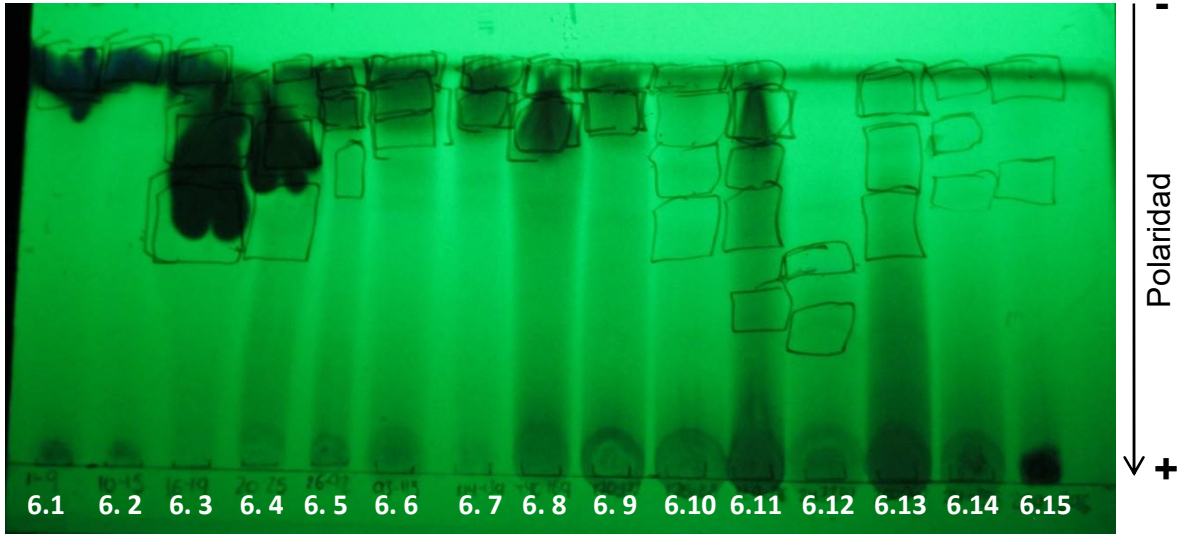
Tres gramos de la fracción 6 se adsorbieron en gel de sílice y se sometieron a CCA, se generaron 296 subfracciones que se agruparon en 15 fracciones secundarias (nomenclatura 6.1→6.15) de acuerdo a su similitud cromatográfica monitoreada en CCF (Cuadro 7). Como se observa en la figura 22, el fraccionamiento fue exitoso ya que el perfil metabólico de las fracciones difirió en cada una de ellas, obteniéndose compuestos más polares a lo largo del proceso. Los rendimientos de cada una de las fracciones se presentan también en el cuadro 7, la mayoría de las fracciones tuvo un rendimiento bajo, solo de las fracciones 6.3, 6.4, 6.8 y 6.11 se obtuvieron más de 100 mg y la fracción 6.3 presentó el rendimiento más alto, lo que indica que la mayoría de los compuestos son de naturaleza poco polar.

Cuadro 7. Denominación, naturaleza y rendimiento de fracciones secundarias de DMPA

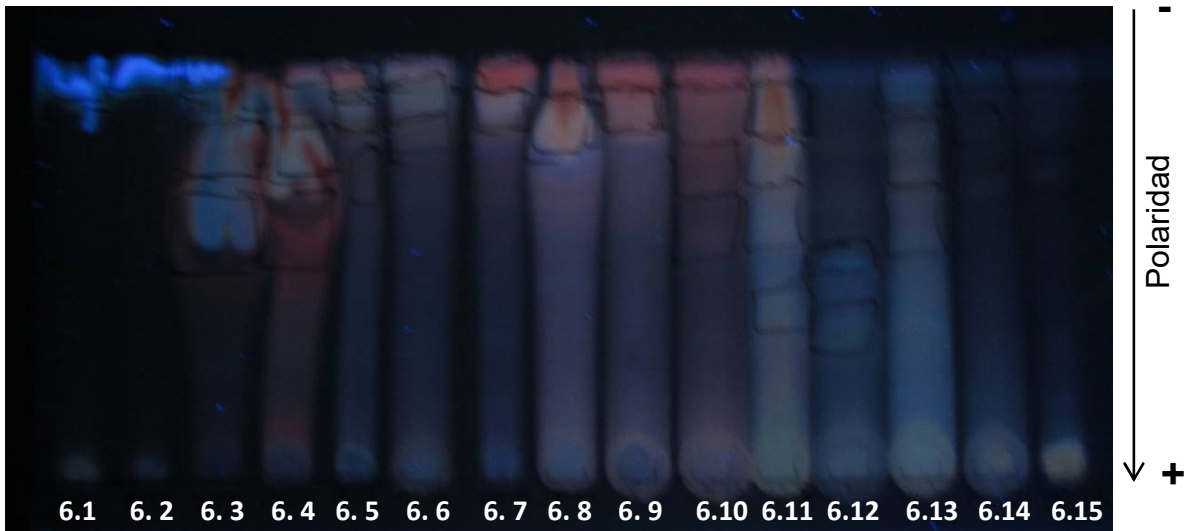
Fracción	Subfracción	Disolvente(s)	Peso* (mg)	Rendimiento** (%)
6		HD 6:4	3000	100
6.1	1-9	HD 1:1	27	0.9
6.2	10-15	HD 4:6	28	0.9
6.3	16-19	HD 4:6- HD 3:7	1123	37.4
6.4	20-25	HD 3:7	198	6.6
6.5	26-92	HD 3:7- HD 1:9-D 1	43	1.4
6.6	93-113	D 1- DM 99:1	63	2.1
6.7	114-139	DM 99:1	55	1.8
6.8	140-169	DM 99:1- DM 98:2	174	5.8
6.9	170-177	DM 98:2	28	0.9
6.10	178-188	DM 98:2- DM 97:3	85	2.8
6.11	189-246	DM 97:3- DM 8:2	116	3.9
6.12	247-249	DM 8:2	23	0.8
6.13	250-260	DM 8:2- DM 7:3	32	1.1
6.14	261-288	DM 7:3- DM 1:1	45	1.5
6.15	288-296	DM 1:1-M 1	25	0.8

*mg de fracción obtenida a partir de 3000 mg de fracción 6. **El valor del rendimiento está determinado a partir de la cantidad total de la fracción 6.

$\lambda = 254 \text{ nm}$



$\lambda = 365 \text{ nm}$



Vainillina sulfúrica

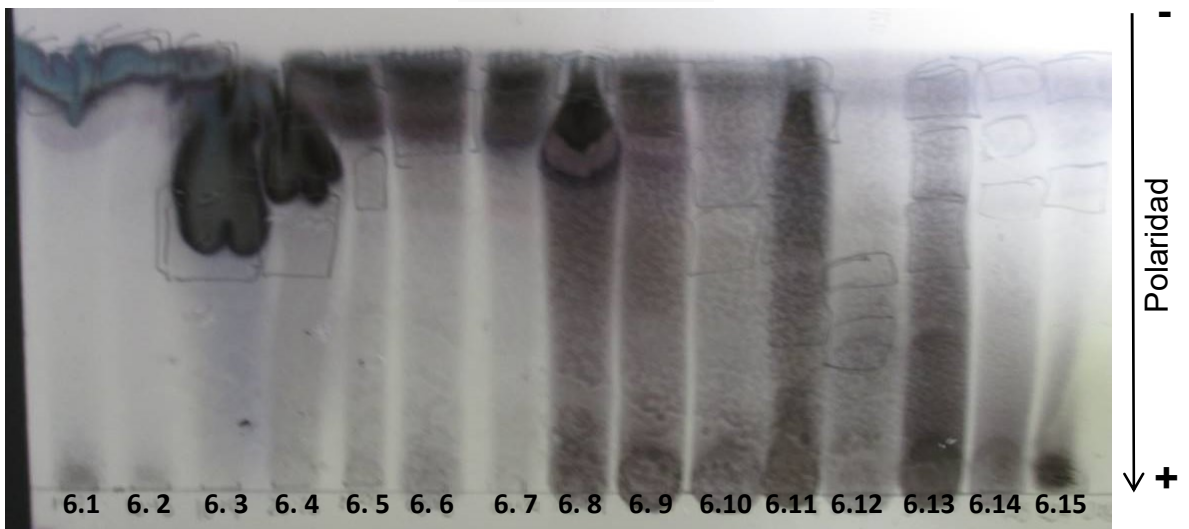


Figura 22. Perfil metabólico de las fracciones secundarias de DMPA. Cromatografía en capa fina. Fase móvil: 7 Diclorometano: 3 Metanol.

A partir de las subfracciones 16 y 17 precipitaron de manera espontánea 17 mg de un sólido cristalino. Este producto se identificó mediante RMN y se obtuvieron los espectros de ^1H y de ^{13}C y bidimensionales (Figura 23).

En primera instancia, en análisis detallado de los espectros unidimensionales (^1H y de ^{13}C) y bidimensionales (COSY, NOESY, HSQC Y HMBC) permitieron identificar una mezcla de partenina y coronopilina. A continuación se detallan las características principales de los espectros:

El espectro de RMN- ^{13}C (Fig. 23a) muestra señales para 15 átomos de carbono. A frecuencias altas se aprecian dos señales en δ_{C} 17.35 ppm (CH_3 -15) y 18.27 ppm (CH_3 -14) que corresponden a dos carbonos de metilo. Enseguida se observan dos señales en δ_{C} 28.37 ppm (C-8) y 29.72 ppm (C-9) que se asignaron a carbonos de un metileno. También hay cinco señales en δ_{C} 40.74 ppm (C-10), 44.23 ppm (C-7), 58.95 ppm (C-5), 78.87 ppm (C-6) y 84.24 ppm (C-1), los dos últimos unidos a función oxigenada y una señal en δ_{C} 163.34 ppm que corresponde al carbono de metino (C-2). En la región comprendida entre δ_{C} 100-160 ppm se aprecian señales en δ_{C} 131.4 ppm (C-3), δ_{C} 140.45 ppm (C-11) y δ_{C} 121.8 ppm (C-13). A frecuencias bajas se aprecian señales en δ_{C} 171.05 ppm (C-12) que corresponde a un éster cíclico y 210.90 ppm (C-4) que corresponde a una cetona.

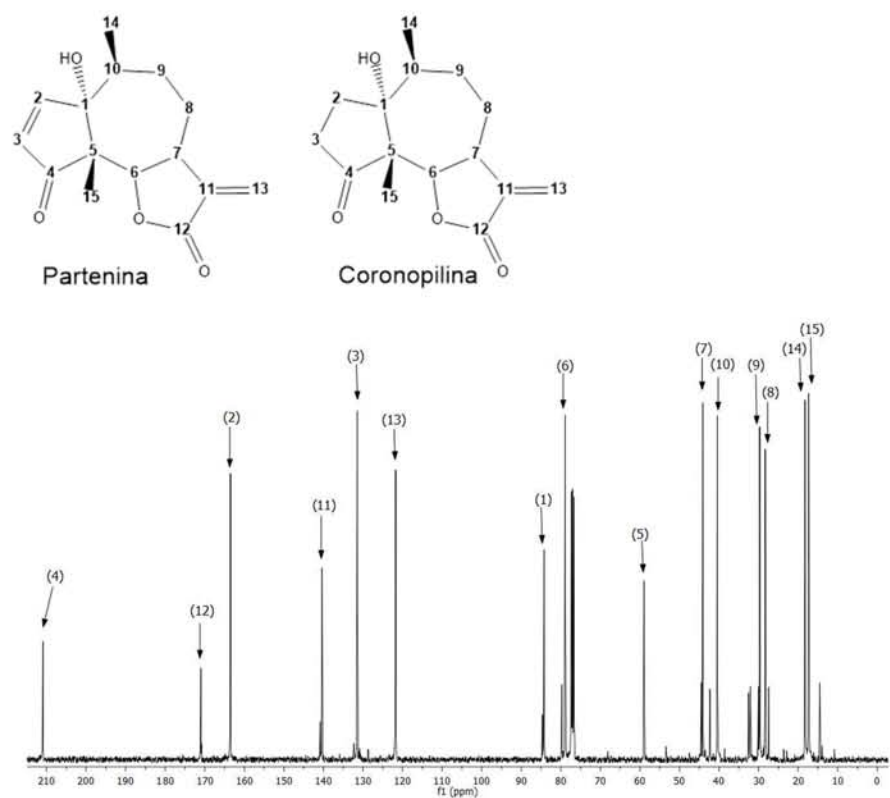
El espectro de RMN- ^1H (Fig. 23b) revela la presencia de seis dobletes, a frecuencias bajas en las señales en δ_{H} 7.6 ppm (d, $J=6$ Hz) (CH -2) y 6.16 ppm (d, $J=6$ Hz) (CH -3) cada una integrando para un protón olefínico conjugado con un carbonilo, las señales en desplazamientos de 6.26 ppm (d, $J=2.8$ Hz) (CH_2 -13) y 5.61 ppm (d, $J=2.4$ Hz) (CH_2 -13) cada una integrando para un protón de un grupo metileno conjugado con una lactona, la señal en δ_{H} 5.02 ppm (d, $J=8$ Hz) (CH -6) y finalmente la señal en δ_{H} 1.11 ppm (d, $J=7.6$ Hz) (CH_3 -15) que integra para tres protones de un grupo metilo. Se observa también una señal simple en δ_{H} 3.53 ppm (m) (CH -7). El espectro muestra cinco señales simples en δ_{H} 2.39 ppm (m) (CH_2 -10), 2.29 ppm (m) (CH_2 -8), 2.19 ppm (m) (CH_2 -8), 1.86 ppm (m) (CH_2 -9) y 1.70 ppm (m) (CH_2 -9) que corresponden a los protones de los grupos metileno que

forman el anillo. Por último, se observa una señal simple en δ_C 1.27 ppm (m) (CH₃-14) que integra para tres protones de un grupo metilo.

Los datos espectrométricos están en armonía con los descritos previamente en la literatura para la partenina (Saucedo *et al.*, 2011; Siddhardha *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2013). No obstante, en el análisis detallado de los espectros se observaron algunas señales gemelas en algunos desplazamientos, lo que permitió saber que la partenina se encontraba en una mezcla con un compuesto relacionado estructuralmente, en este caso, coronopilina. La diferencia entre coronopilina y partenina es el doble enlace entre los carbonos 2 y 3, por tanto los desplazamientos en las RMN son similares, pero en el espectro de RMN-¹H se observan señales a frecuencias altas (1.5-3 ppm) que corresponden a los protones adicionales en la coronopilina. Mediante la integración de los picos se calculó que la mezcla de partenina:coronopilina se encuentra en una proporción 4:1 respectivamente.

Estas lactonas sesquiterpénicas, en especial la partenina, ha sido ampliamente reportada en esta especie medicinal (Patel, 2011).

a)



b)

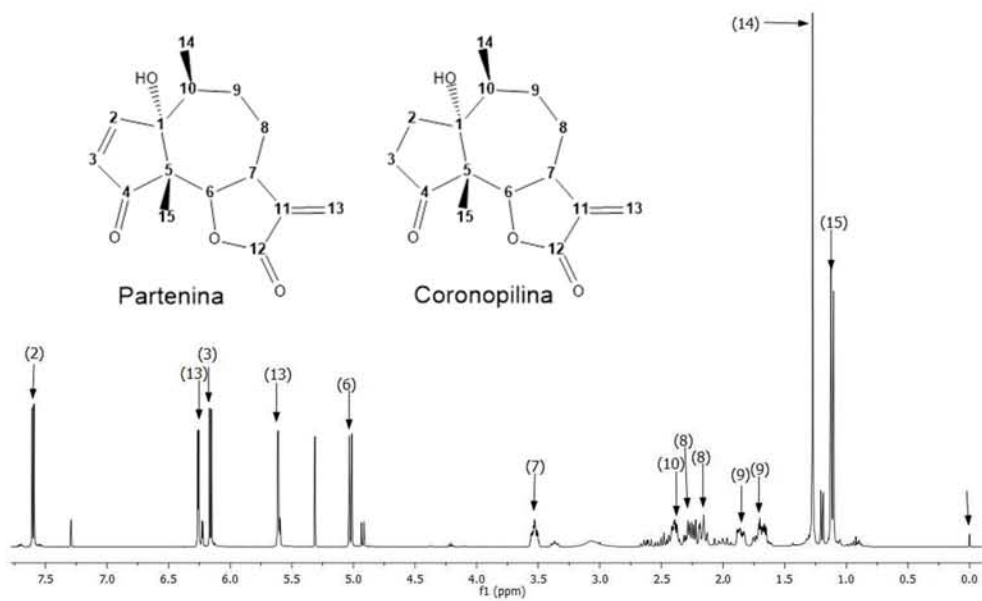


Figura 23 . Espectros de resonancia magnética nuclear. a) RMN- ^{13}C (100 MHz, CDCl_3). b) RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3).

Posteriormente se evaluó la actividad antiadherente de las 15 fracciones secundarias (Cuadro 8).

Cuadro 8. Actividad anti-adherente de fracciones secundarias de DMPA

Fracción	Actividad anti-adherente (% Inhibición)	
	0.025 mg/ml	0.5 mg/ml
6	55.7	80.4
6.1	36.9	59.2
6.2	0.0	57.4
6.3	38.4	44.1
6.4	32.1	61.7
6.5	41.4	63.9
6.6	29.3	54.6
6.7	47.25	57.5
6.8	42.3	74.1
6.9	47.2	70.8
6.10	49.3	79.4
6.11	37.8	74.8
6.12	41.22	63.0
6.13	48.8	82.1
6.14	53.0	82.8
6.15	36.8	60.4

La mayoría de las fracciones inhibió parcialmente la adherencia, las fracciones 6.1-6.3, 6.6, 6.7 y 6.15 presentaron las actividades más bajas, inhibiendo menos del 60% de la adherencia a 0.5 mg/ml (Cuadro 8).

La actividad antiadherente se concentró en las fracciones 6.10, 6.13 y 6.14 ya que la actividad se mantuvo como en la fracción primaria 6, sin embargo el rendimiento es bajo (cuadro 7) y la complejidad metabólica es alta (Fig. 22) por lo que no se continuó con el fraccionamiento biodirigido. No obstante, ya se tienen detectadas algunas fracciones que pudieran ser sujetas a más procesos de purificación y de los cuales pudieran ser obtenidos compuestos activos.

Nuevamente, se observó un efecto máximo, que sugiere una limitación en el número o tipo de receptores que las fracciones pueden bloquear, además es probable que la actividad este dada por sinergismo entre varios metabolitos secundarios.

La mezcla de partenina/coronopilina no fue evaluada debido al bajo rendimiento, no obstante la fracción 6.3, cuyas subfracciones dieron origen a la mezcla, inhibió parcialmente la adherencia, en menor porcentaje que el extracto DMPA y la fracción 6. Con estos resultados se pudiera pensar que: 1) la partenina no tiene actividad antiadherente o 2) que los compuestos que la acompañan en la fracción 6.3 enmascaran su efecto. Para tratar de descartar alguna de estas posibilidades, se evaluó la actividad antiadherente de partenina pura, resultando que este compuesto inhibió entre el 40 y 55% al emplear 0.05 y 0.5 mg/ml, por tanto no es responsable de la actividad de la fracción 6 o el extracto DMPA, o actúa sinérgicamente con otros compuestos (Fig. 24)

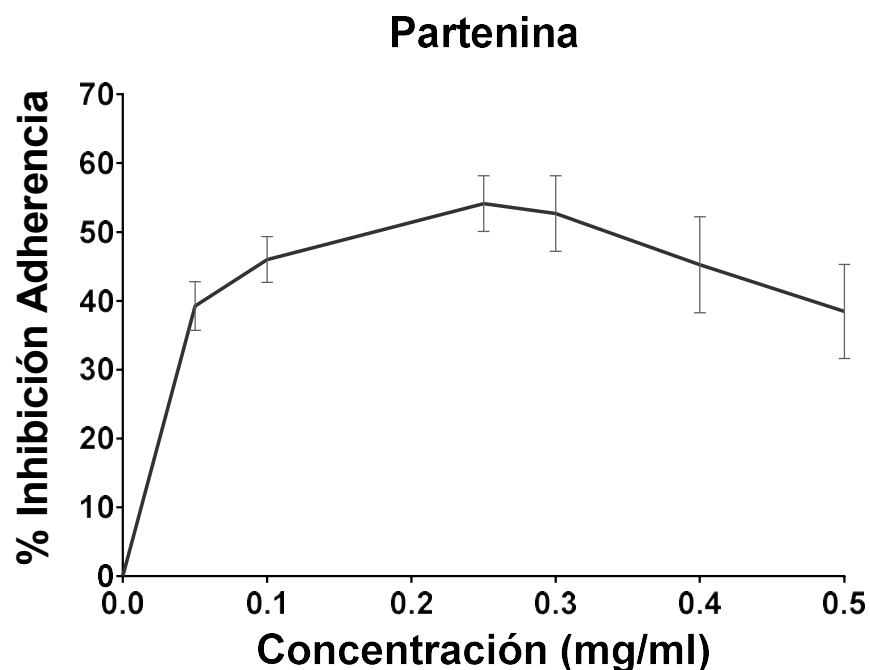


Figura 24. Efecto de partenina sobre la adherencia de *H. pylori*. La curva representa el promedio de tres réplicas independientes por cuadruplicado \pm error estándar de la media.

7.5 Efecto de compuestos puros sobre la adherencia de *H. pylori*.

Considerando que la fitoquímica de *P. hysterophorus* ha sido ampliamente estudiada, se evaluó la actividad antiadherente de siete compuestos reportados en la especie.

En la figura 25 se muestra el porcentaje de inhibición de cada compuesto y del extracto DMPA a diferentes concentraciones. La quercetina y el ácido ursólico presentaron la mejor actividad, inhibiendo entre el 50 y 60% de la adherencia desde 0.05 hasta 0.5 mg/ml de manera constante e independiente de la concentración. En comparación con el extracto DMPA, estos compuestos fueron mas potentes, al inhibir más que el extracto a bajas concentraciones, no obstante el extracto fue más eficaz a 0.5 mg/ml. Este efecto refleja que ambos compuestos pueden adherirse a un tipo limitado de receptores (Fig. 25a).

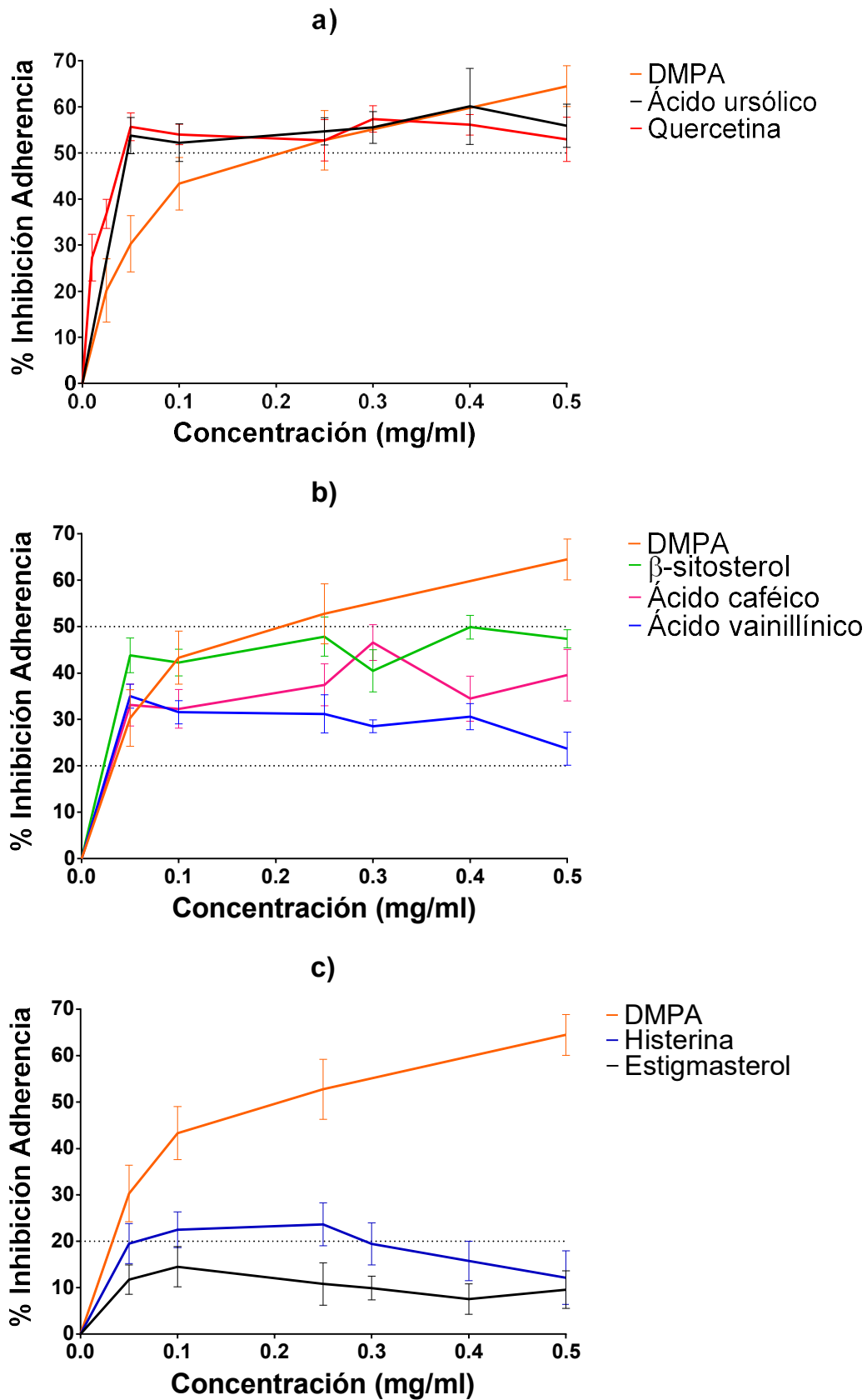


Figura 25. Efecto de compuestos puros sobre la adherencia de *H. pylori*. (DM= extracto diclorometano-metanólico). Cada barra representa el promedio de tres réplicas independientes por nonuplicado \pm error estándar de la media.

Cuatro de los compuestos presentaron una actividad antiadherente moderada, el β -sitosterol inhibió entre 40 y 50%, el ácido caféico entre 30 y 40%, mientras que el ácido vainillínico cerca de 30% de manera constante. El efecto de estos compuestos también sugieren que presentan un mecanismo de acción limitado a uno o varios receptores responsables de la adherencia y aunque se aumente la concentración, los compuestos no se unirán a mas receptores (Fig. 25b).

Por último, la histerina y el estigmasterol presentaron baja actividad, la histerina inhibió entre el 15 y 20% de la adherencia, mientras que el estigmasterol inhibió entre un 5 y 15% (Fig 25c).

Si se considera que estos compuestos se encuentran en la planta, y en el extracto DMPA, dado la naturaleza de los solventes con los que fue elaborado, hay dos posibilidades: 1) que actúen de manera sinérgica para inhibir la adherencia en la proporción lograda por el extracto, o 2) el extracto tiene otros compuestos responsables de esta actividad biológica.

Ningún estudio previo había reportado la actividad inhibitoria de estos compuestos sobre la adherencia de *H. pylori*, por lo que estos resultados son una contribución importante acerca del conocimiento farmacológico de *P. hysterothorus*.

7.6 Mecanismo de acción de la actividad antiadherente del extracto DMPA.

Hay alrededor de 40 adhesinas descritas involucradas en la adhesión de *H. pylori* al epitelio gástrico (Teneberg *et al.*, 1997; Odenbreit *et al.*, 1999; Testerman *et al.*, 2001; Rossez *et al.*, 2014). Entre las más estudiadas están SabA y BabA, adhesinas presentes en la bacteria que se unen a glicoconjugados en la membrana de las células de la mucosa gástrica. SabA se une de manera específica a compuestos sialilados, como Lewis X, a través de la interacción con ácido siálico, mientras que BabA a oligosacáridos fucosilados, por ejemplo Lewis B (Walz, *et al.*, 2005).

Para comenzar el estudio del mecanismo a través del cual el extracto DMPA inhibe la adherencia y ver si su acción es a través de SabA o BabA, se

evaluó la adherencia tras la preincubación de *H. pylori* o células AGS con DMPA en combinación con ácido siálico, que inhibe mediante su unión a SabA, o fucosa, que inhibe mediante su unión a BabA.

7.6.1 Efecto de ácido siálico y fucosa sobre la adherencia de *H. pylori*.

En primer lugar se determinó el efecto de estas moléculas tras incubarlas simultáneamente con *H. pylori* y células AGS durante 1 hora como se describe en la sección 6.8. Como se observa en la figura 26, el ácido siálico inhibe entre el 3 y 10% de la adherencia a concentraciones de entre 1 y 5 $\mu\text{g/ml}$. A concentraciones de entre 10 y 500 $\mu\text{g/ml}$ se inhibe entre el 20 y 30% de la adherencia. La incubación con fucosa también disminuyó la capacidad de adherencia, a concentraciones de entre 1 y 5 $\mu\text{g/ml}$ se inhibió entre el 8 y 15 %, mientras que a las concentraciones de 10 a 500 $\mu\text{g/ml}$ se inhibió entre el 26 y 39%.

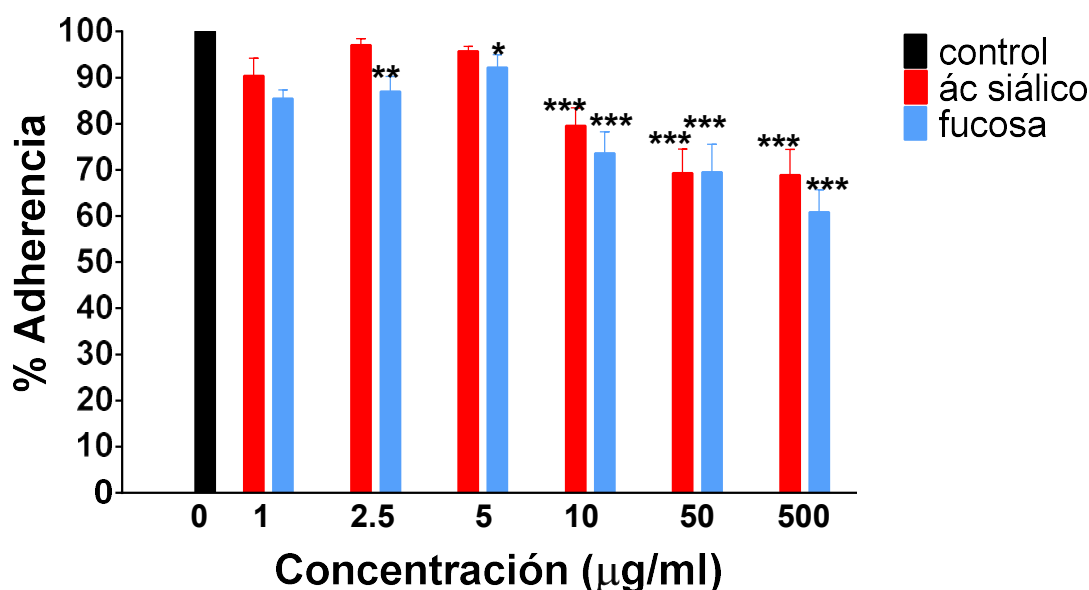


Figura 26. Efecto de la incubación simultánea de compuestos antiadherentes con células AGS y *H. pylori*. Cada barra representa el promedio de tres réplicas independientes por cuadruplicado \pm error estándar de la media. Análisis de varianza de dos vías, postanálisis de Bonferroni para comparación múltiple de medias. Las diferencias estadísticas se determinaron con respecto al control negativo. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

Dado que con ambos compuestos se observa un efecto significativo desde 10 $\mu\text{g/ml}$ se escogió ésta concentración para realizar los siguientes experimentos.

Posteriormente se determinó el efecto de estas moléculas tras incubarlas previamente a la infección, con las células AGS o con *H. pylori*. Se encontró que al preincubar a las células AGS con ácido sálico o fucosa no hubo diferencia significativa respecto al control (Fig. 27a), mientras que al preincubar *H. pylori* con estos compuestos disminuyó la adherencia bacteriana significativamente. Por un lado, el ácido sálico disminuyó el 16 ± 4 % de la adherencia y la fucosa disminuyó el 21 ± 5 % de ésta (Fig. 27b). Estos resultados no presentaron diferencia significativa con los obtenidos al administrar $10 \mu\text{g/ml}$ en el experimento anterior (Fig. 26), confirmando el mecanismo de acción de estas moléculas, al inhibir la adherencia mediante su unión a las adhesinas SabA y BabA de *H. pylori*.

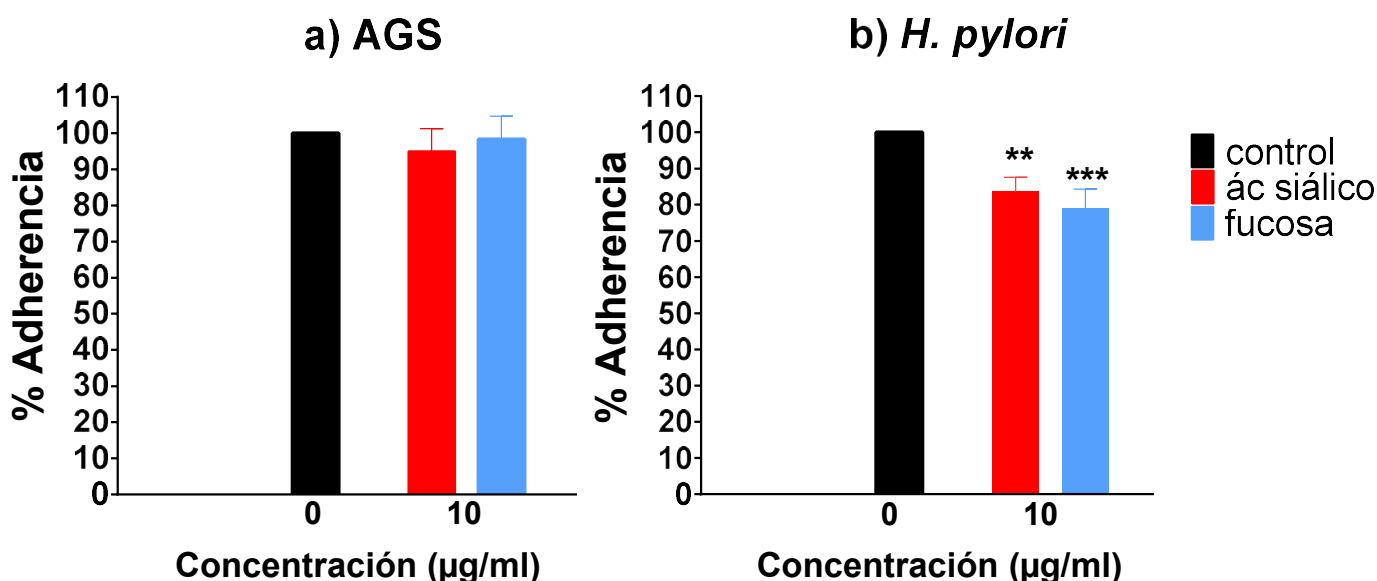


Figura 27. Efecto de la preincubación de compuestos antiadherentes con a) células AGS. b) *H. pylori*. Cada barra representa el promedio de tres réplicas independientes por cuadruplicado \pm error estándar de la media. Análisis de varianza de dos vías, postanálisis de Bonferroni para comparación múltiple de medias. Las diferencias estadísticas se determinaron con respecto al control negativo. ** $p<0.01$ *** $p\leq 0.001$.

A continuación se evaluó el efecto conjunto de ácido siálico y fucosa incubados con *H. pylori* (Fig. 28). Entonces se preincubaron las bacterias con ácido siálico, fucosa o vehículo durante 1h, se lavaron y se incubó 1h con el otro compuesto, se realizó un lavado más y se incubaron las células AGS con *H. pylori* por 1h.

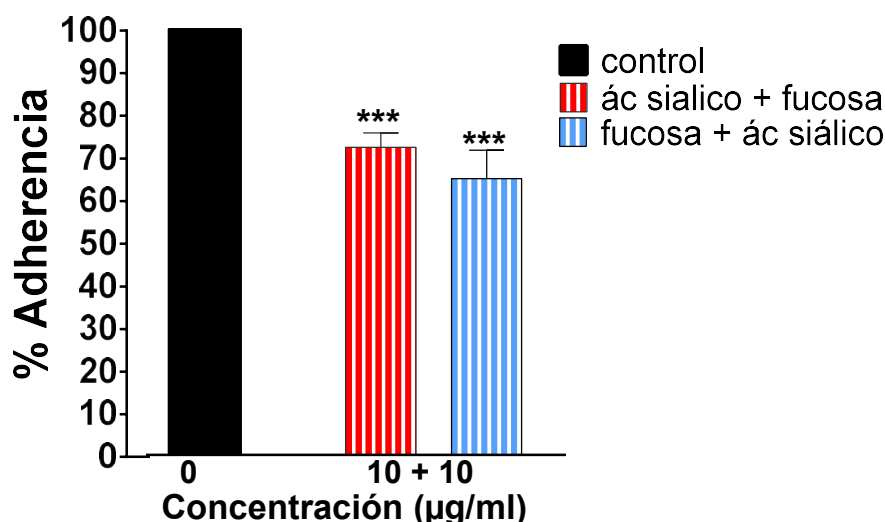


Figura 28. Efecto de la preincubación secuencial de ácido siálico y fucosa con *H. pylori*. Cada barra representa el promedio de tres réplicas independientes por cuadruplicado \pm error estándar de la media. Análisis de varianza de dos vías, postanálisis de Bonferroni para comparación múltiple de medias. Las diferencias estadísticas se determinaron con respecto al control negativo. *** $p \leq 0.001$.

Al incubar *H. pylori* primero con ácido siálico y después con fucosa disminuyó el 28 ± 3 % de la adherencia, si se considera que el ácido siálico inhibió el 16% y la fucosa el 21% (Fig. 27b) no hay un efecto aditivo, por lo que podemos inferir que el ácido siálico ocupa sus sitios de unión, permitiendo que la fucosa se una parcialmente a las bacterias y lleve a cabo su efecto. Cuando se preincubó *H. pylori* con fucosa y posteriormente con ácido siálico, se inhibió el 35 ± 7 % de la adherencia. Se puede sugerir que hay un efecto aditivo, donde la fucosa ocupa sus sitios de unión a las bacterias ($21 \pm 5\%$) y permite al ácido siálico unirse a sus sitios posteriormente ($16 \pm 4\%$) (Fig. 27b). Estos resultados corroboran la unión de estas moléculas a sus receptores correspondientes.

7.6.2 Efecto del extracto DMPA sobre AGS o *H. pylori*.

A continuación se evaluó el efecto antiadherente del extracto DMPA sobre las células AGS o *H. pylori* de manera independiente tras su incubación durante 1h antes de realizar el proceso de infección.

Al preincubar a las células AGS con DMPA se inhibió entre el 16 y 22% de la adherencia de las bacterias sin una diferencia significativa entre las tres concentraciones evaluadas (10, 50 y 100 µg/ml) (Fig. 29a), esto indica que el extracto ocupó todos sus sitios posibles desde la concentración de 10 µg/ml y aunque se aumentó la concentración de compuestos activos, ya no hubo más sitios de acción que ocupar. Por otro lado, al preincubar *H. pylori* con DMPA (Fig. 29b) se observó una inhibición mayor de la adherencia, alcanzando hasta $37\pm 2\%$ con 10 µg/ml. Sin embargo, el efecto disminuyó hasta inhibir $16\pm 6\%$ con 100 µg/ml, esto podría explicarse con un impedimento físico de ocupar los sitios de unión debido a la gran cantidad de extracto que está en contacto con las bacterias.

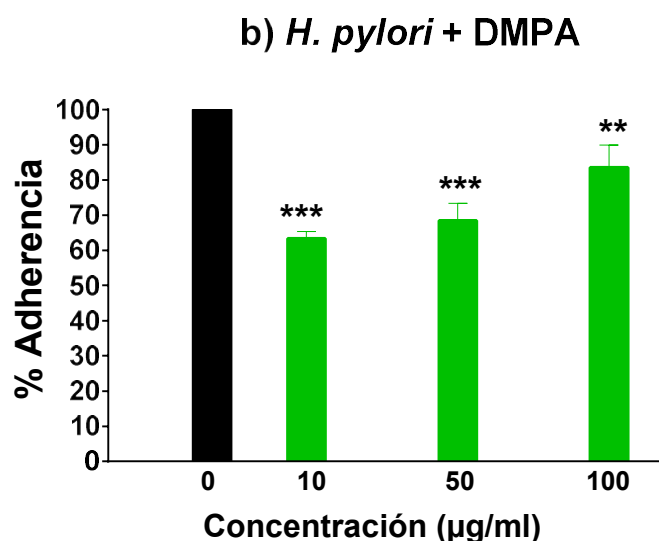
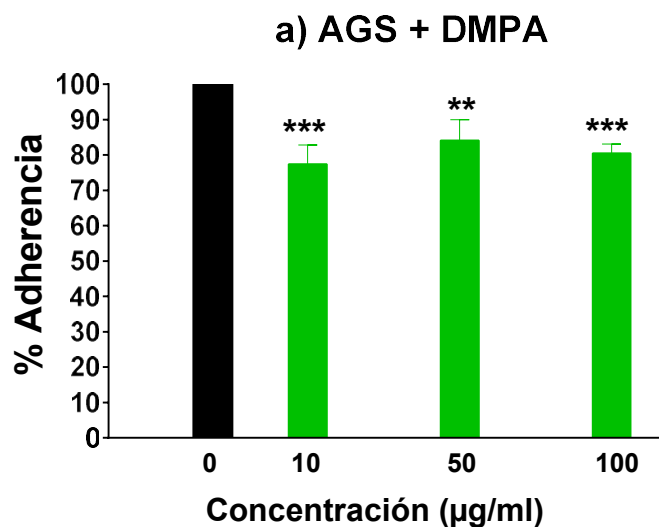


Figura 29. Efecto de la preincubación de a) células AGS con DMPA o b) *H. pylori* con DMPA (DM= extracto diclorometano-metanólico). Cada barra representa el promedio de tres réplicas independientes por cuadruplicado \pm error estándar de la media. Análisis de varianza de dos vías, postanálisis de Bonferroni para comparación múltiple de medias. Las diferencias estadísticas se determinaron con respecto al control negativo. ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

Al comparar el efecto del extracto DMPA preincubado con las células AGS o con *H. pylori* y el efecto que se encontró previamente al incubar de manera simultánea los tres (Fig. 16b), observamos que en el segundo caso aumentó el porcentaje de inhibición de manera dependiente de la concentración, con 50 µg/ml se inhibió $30 \pm 7\%$ de la adherencia y con 100 µg/ml el $43 \pm 6\%$, podría decirse que al incubar de manera simultánea, los compuestos activos pueden ocupar sitios

tanto en las células AGS como en *H. pylori* y por eso el comportamiento del extracto es distinto.

Ya sabiendo la eficacia del extracto DMPA de manera independiente, se realizó un experimento en el cual el extracto DMPA se añadió posteriormente a haber preincubado a las células AGS 1h con ácido siálico o fucosa realizando lavados entre cada adición. En la figura 30 se muestran estos resultados.

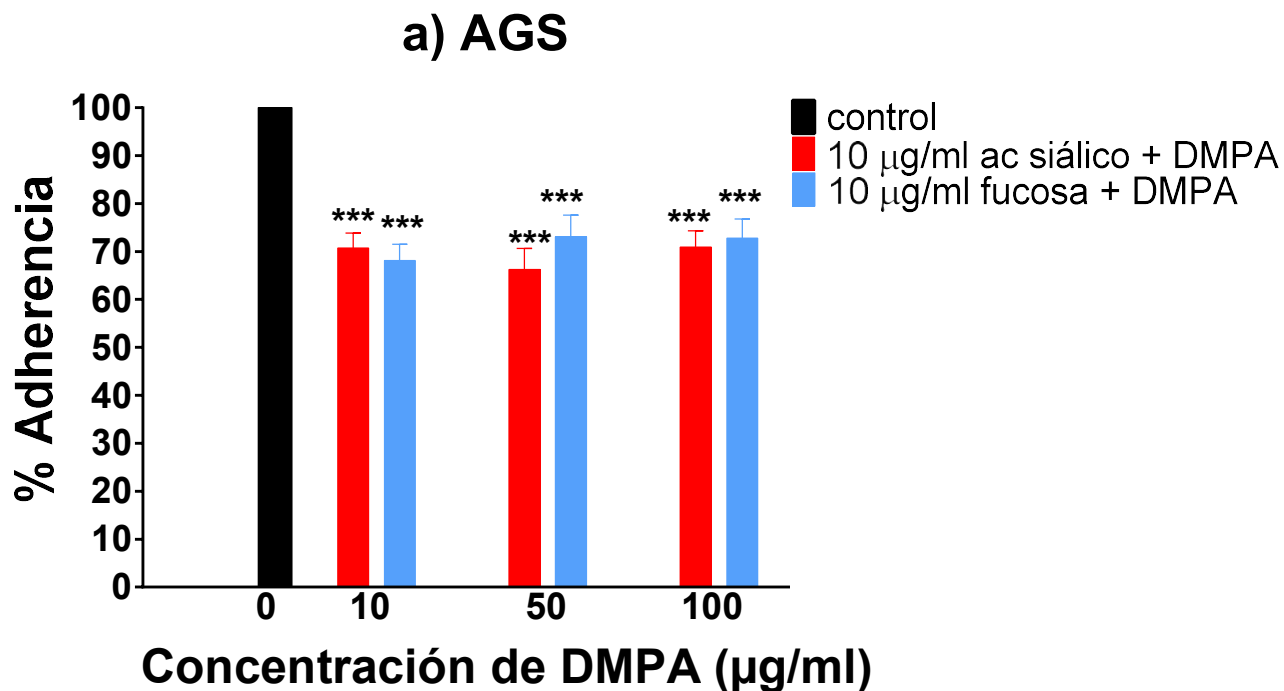


Figura 30. Efecto de la preincubación secuencial de células AGS con a) ácido siálico o fucosa y DMPA (DM= extracto diclorometano-metanólico). Cada barra representa el promedio de tres réplicas independientes por cuadruplicado \pm error estándar de la media. Análisis de varianza de dos vías, postanálisis de Bonferroni para comparación múltiple de medias. Las diferencias estadísticas se determinaron con respecto al control negativo. *** $p < 0.001$.

Al preincubar a las células AGS con 10 µg/ml de ácido siálico y posteriormente con diferentes concentraciones de DMPA se inhibió el 30% de la adherencia aproximadamente, sin diferencia significativa entre las concentraciones y sin diferencia significativa con los resultados obtenidos al añadir solo DMPA, (Fig. 29a). Si se considera que no hay efecto sobre la adherencia por parte del ácido siálico cuando se incuba con las células AGS (Fig. 27a), estos resultados

indican que el extracto DMPA ocupa todos sus sitios de unión posibles en las células AGS y que es responsable de la inhibición de la adherencia observada.

Cuando se preincubó AGS con 10 $\mu\text{g/ml}$ de fucosa y posteriormente con diferentes concentraciones de DMPA (Fig. 30) se inhibió aproximadamente el 28% de la adherencia, sin diferencia significativa entre las concentraciones y sin diferencia significativa al administrar solo DMPA (Fig. 29a). La fucosa no tiene actividad antiadherente al preincubar a las células AGS (Fig. 27a), por tanto en este caso, la actividad inhibitoria está dada enteramente por el extracto DMPA.

Posteriormente se evaluó la eficacia del extracto DMPA tras haber preincubado a *H. pylori* con ácido siálico o fucosa o la preincubación secuencial de ambos, realizando lavados entre cada adición.

Al preincubar *H. pylori* con 10 µg/ml de ácido siálico y posteriormente con 10, 50 o 100 µg/ml de DMPA (Fig. 31a) se inhibió la adherencia 29.6±4 %, 22.6±5 % y 17.4±5 % respectivamente. Estos resultados no presentan diferencia significativa entre las concentraciones ni con los obtenidos al preincubar solo con el extracto DMPA (Fig. 29b). En este experimento, el ácido siálico ocupa los sitios SabA en la bacteria (16±4% de inhibición de la adherencia) (Fig. 27b) y cuando DMPA entra en contacto con las bacterias, el resto de la inhibición es producto de la interacción de DMPA a sitios diferentes, indicándonos que el extracto y el ácido siálico comparten la unión a SabA y DMPA posee compuestos con diferente blanco de acción.

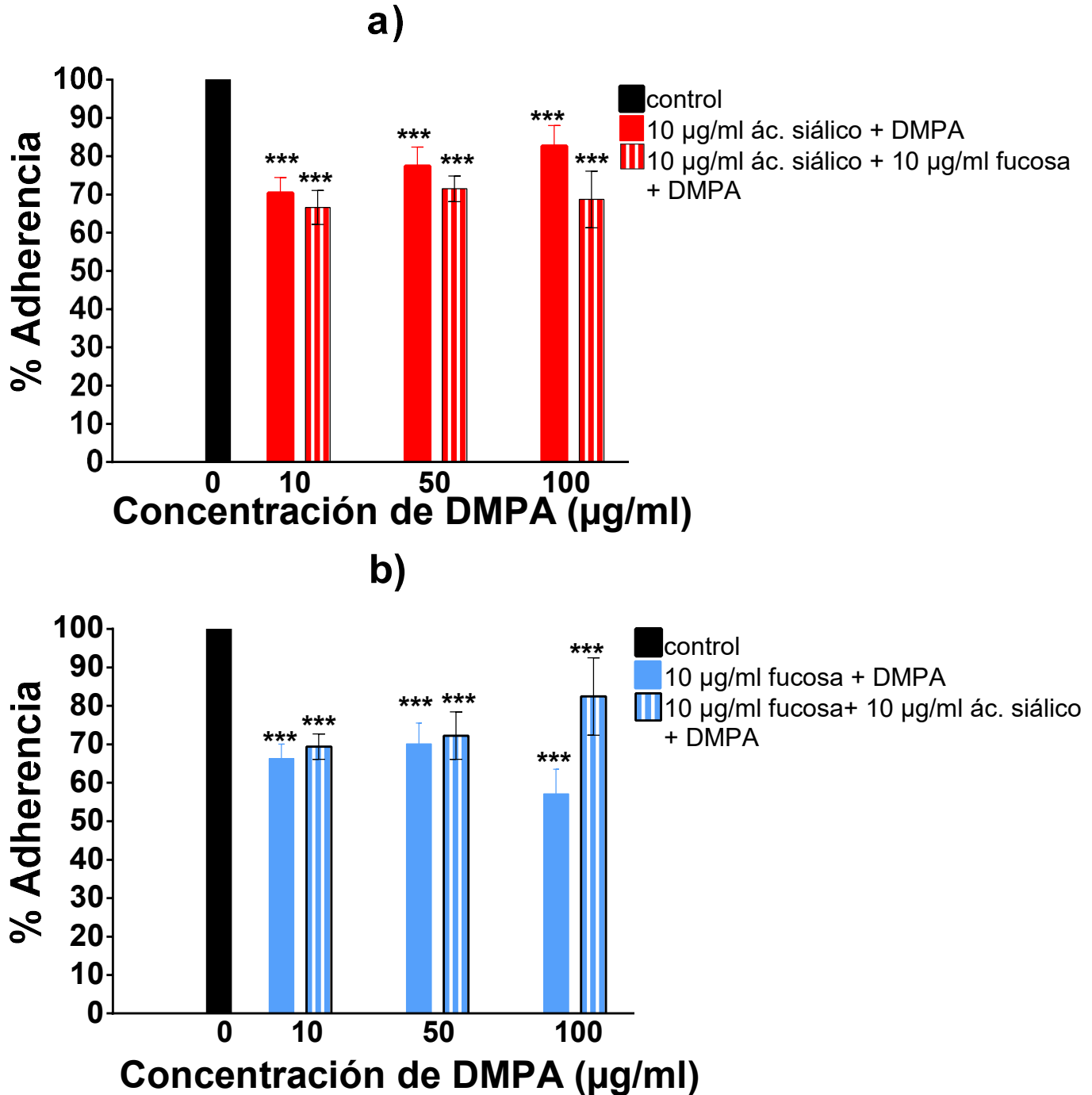


Figura 31. Efecto de la preincubación secuencial de *H. pylori* con a) ácido siálico, fucosa y DMPA o b) fucosa, ácido siálico y DMPA (DM= extracto diclorometano-metanólico). Cada barra representa el promedio de tres réplicas independientes por cuadruplicado \pm error estándar de la media. Análisis de varianza de dos vías, postanálisis de Bonferroni para comparación múltiple de medias. Las diferencias estadísticas se determinaron con respecto al control negativo. *** $p < 0.001$.

Mientras que al incubar con ácido siálico, seguido de fucosa y por último DMPA (Fig. 31a) se inhibió el 30% de la adherencia aproximadamente independientemente de la concentración y sin diferencia significativa que al incubar a las bacterias con ácido siálico y posteriormente con fucosa (Fig. 28). Por tanto, al no aumentar ese porcentaje de inhibición ($28\pm 3\%$) con la incubación de DMPA, ahora podemos inferir que DMPA presenta compuestos que comparten sus blancos de acción con el ácido siálico y la fucosa, es decir, SabA y BabA.

Por otra parte, tras la preincubación de *H. pylori* con 10 $\mu\text{g/ml}$ de fucosa y posteriormente con 10, 50 o 100 $\mu\text{g/ml}$ de DMPA (Fig. 31b) se inhibió $33.7\pm 3\%$, $29.9\pm 5\%$ y $42.9\pm 6\%$ de la adherencia respectivamente. Estos resultados no presentan diferencia significativa entre las concentraciones ni los obtenidos al preincubar solo con 10 o 50 $\mu\text{g/ml}$ de DMPA (Fig. 29b). Bajo el razonamiento anterior, podemos suponer que existe en DMPA una cantidad determinada de moléculas que se unen tanto a BabA como a otros sitios de la bacteria involucrados con la adherencia. Y al administrar 10 $\mu\text{g/ml}$ de fucosa, seguido de 10 $\mu\text{g/ml}$ de ácido siálico y por último DMPA (Fig. 31b) se inhibió cerca del 30% de la adherencia, confirmando que DMPA inhibe la interacción de *H. pylori* con las células a través de su unión con SabA y BabA.

7.7 Evaluación de la citotoxicidad de los extractos.

Considerando que se ha descrito la capacidad alergénica y alelopática de *P. hysterophorus* (Maishi *et al.*, 1998; Khaliq *et al.*, 2015) y existiendo la posibilidad de que hubiera un efecto dañino de alguno de los extractos sobre las células AGS en los ensayos de adherencia, se exploró su posible efecto tóxico y hacer consideraciones acerca de su utilidad. Esta evaluación se realizó mediante la medición de la viabilidad celular tras la incubación con los extractos y la integridad del epitelio tras la incubación con el extracto DMPA.

7.7.1 Evaluación de la viabilidad celular.

La cuantificación de la viabilidad celular se realizó en células AGS a través de la reducción de MTT y la cuantificación colorimétrica del formazán producido en las mitocondrias, al incubar las células en presencia o ausencia de los extractos

durante 1 y 24 h. El extracto HR solo se evaluó a 50 y 500 µg/ml debido a su bajo rendimiento.

En la figura 32 se presentan los resultados de la incubación por 1 h de células AGS con los extractos de *P. hysterothorus*. La incubación de las células AGS con los extractos HR, DR y MR resultó en una disminución significativa de la viabilidad celular desde 50 µg/ml, mientras que al incubar con DMR disminuyó al administrar 1000 µg/ml y AR no tuvo efecto sobre la viabilidad celular a ninguna de las concentraciones evaluadas. Respecto a los extractos de partes aéreas, la mayoría disminuyó la viabilidad celular desde 500 µg/ml, excepto APA, que no tuvo efecto.

Con estos resultados se puede discutir si el efecto antiadherente está influenciado por la muerte celular, en algunos casos el porcentaje de inhibición de la adherencia es parecido al porcentaje de disminución de la viabilidad celular. No obstante, los extractos más activos, DMR y DMPA, la inhibición de la adherencia fue significativamente mayor a la citotoxicidad, demostrando que el efecto antiadherente no está dado por la muerte de las células. Finalmente, los extractos acuosos no disminuyeron la viabilidad celular a ninguna concentración y tienen un ligero efecto inhibitorio. Para poder eliminar esa incertidumbre, habría que evaluar la adherencia con preparaciones fijadas.

Por otra parte, al incubar las células con los extractos por 24 h se observó una citotoxicidad de parte de casi todos los extractos, excepto los acuosos, donde AR no fue tóxico a ninguna concentración y AR sólo a altas concentraciones como son 500 y 1000 µg/ml (Fig. 33).

Se ha reportado la citotoxicidad de los extractos en otras líneas celulares humanas. Kumar *et al.*, en 2013 reportó la citotoxicidad de extractos sucesivos de las hojas de *P. hysterothorus* en tres líneas celulares cancerígenas: THP-1 (leucemia), MCF-7 (mama) y DU-145 (próstata) incubándolas con 100 µg/ml de extracto por 48 horas mediante el ensayo de Sulfurodamina B. El extracto etanólico inhibió el 85, 81 y 50% de la proliferación celular de THP-1, MCF-7 y DU-145, respectivamente. Los extractos clorofórmico y de acetato de etilo inhibieron

~50% de la proliferación celular, mientras que el extracto bencénico inhibió solamente a la línea MCF-7 53%. El extracto acuoso no tuvo efecto citotóxico. En nuestro trabajo se evaluó la citotoxicidad tras 24 horas de incubación como máximo, no obstante también observamos que los extractos acuosos, especialmente el de raíz, no fueron citotóxicos, excepto el extracto APA en concentraciones de 500 y 1000 µg/ml tras 24 horas de incubación. Eso nos sugiere que el uso tradicional de la planta (decocción) es seguro, ya que en ambos estudios, los extractos acuosos no fueron citotóxicos. El extracto etanólico reportado por el grupo de Kumar y col. y el metanólico reportado en este trabajo, presentan porcentajes de citotoxicidad similares (~80%), a concentraciones similares, esto puede deberse a la similitud de la polaridad de los solventes y por tanto de los compuestos que ambos extractos contienen.

Por otra parte, al extracto etanólico de raíces se le calculó una $IC_{50}=282.8$ µg/ml tras la incubación de células MRC-5 (pulmón) por 48 h (Fernández-Calienes *et al.*, 2010).

En cuanto a la partenina se reportó una $DL_{50}= 42$ mg/kg en ratas (Narasimham *et al.*, 1984) y la inducción de aberraciones cromosomales en linfocitos expuestos a 10-60 µM por 20 horas (Ramos *et al.*, 2002). Tomando en cuenta que este compuesto se aisló del extracto DMPA, es probable que contribuya a la citotoxicidad del extracto.

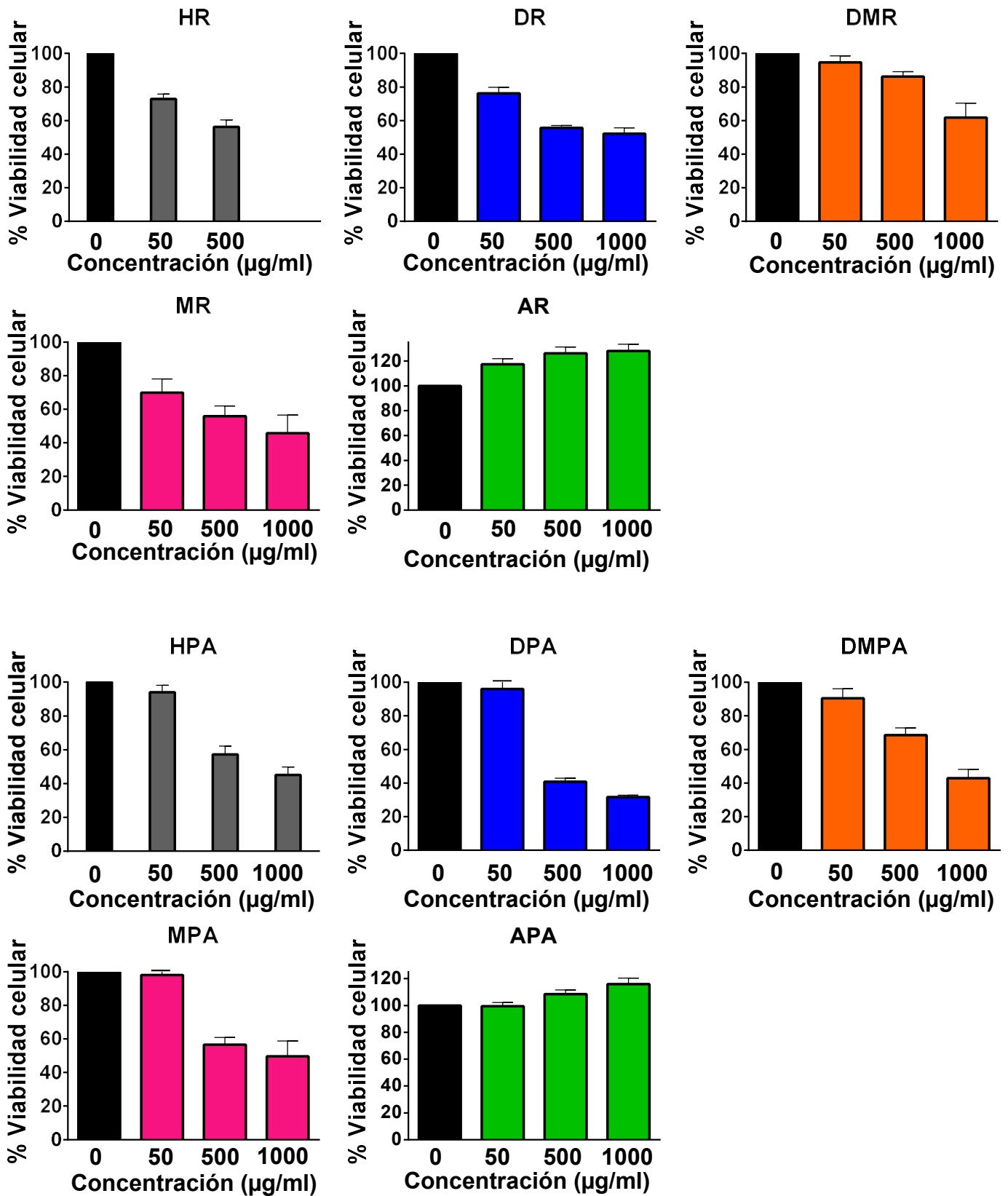


Figura 32. Efecto de los extractos de *P. hysterophorus* sobre la viabilidad celular de AGS. Incubación durante 1 h. (H= extracto hexánico, D= extracto diclorometánico, DM= extracto diclorometano-metanólico, M= extracto metanólico, A= extracto acuoso). Cada barra representa el promedio de tres réplicas independientes por no duplicado \pm error estándar de la media.

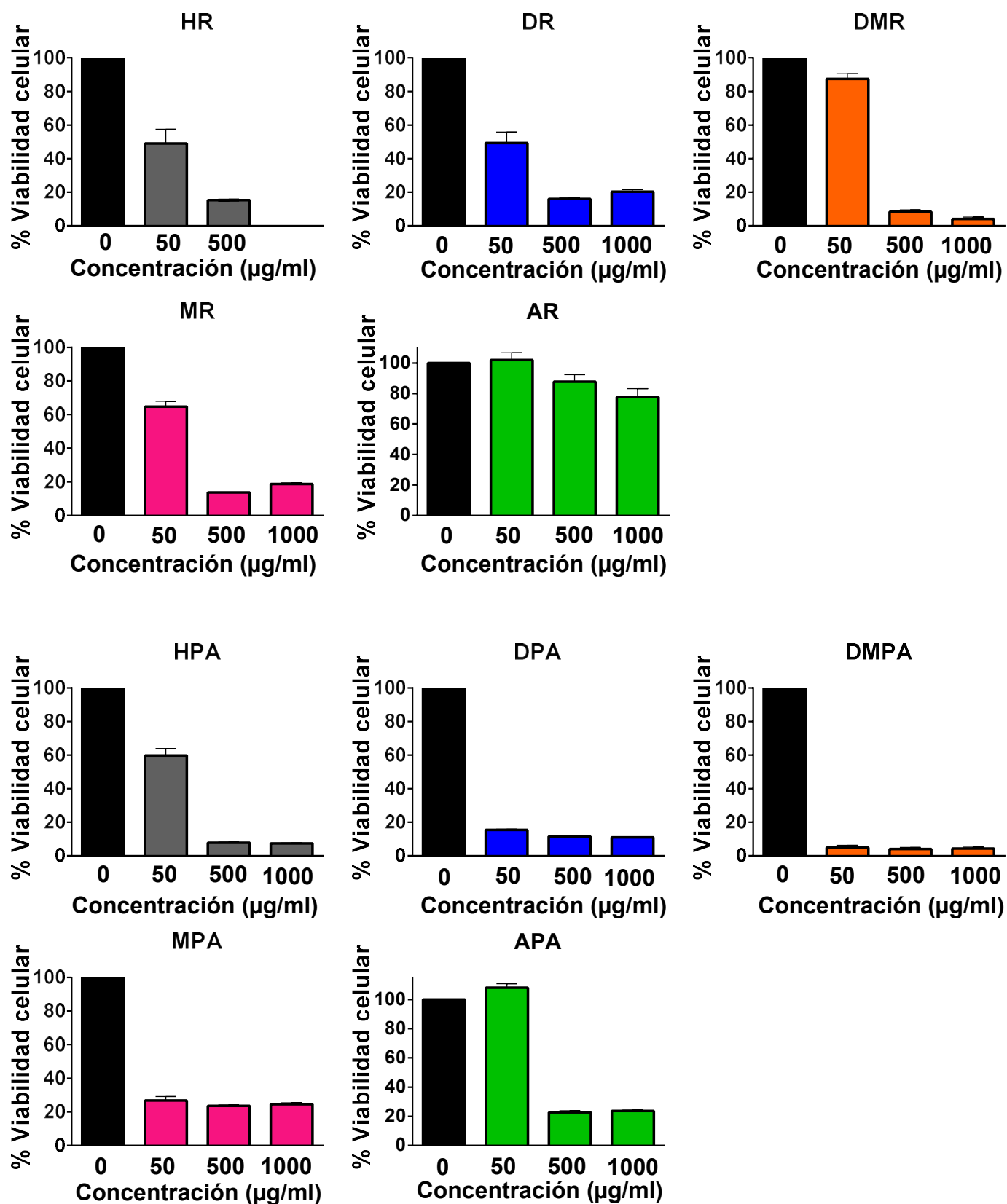


Figura 33. Efecto de los extractos de *P. hysterophorus* sobre la viabilidad celular de AGS. Incubación durante 24 h. (H= extracto hexánico, D= extracto diclorometánico, DM= extracto diclorometano-metanólico, M= extracto metanólico, A= extracto acuoso). Cada barra representa el promedio de tres réplicas independientes por no duplicado \pm error estándar de la media.

7.7.2 Efecto del extracto DMPA sobre la integridad del epitelio.

Dado que el extracto DMPA presentó la mejor actividad anti-adherente, se evaluó su efecto sobre la integridad del epitelio a través de la cuantificación de la Resistencia eléctrica transepitelial (TEER) en dos líneas celulares: AGS, utilizada para los experimentos de adherencia y LLC-PK1, cuya monocapa presenta uniones intercelulares más estables.

Después de 5 días de la siembra en insertos Transwell® se observó que las células AGS tenían valores de TEER de 120-140 Ω/cm^2 y las células LLC-PK1 de 195-215 Ω/cm^2 (Fig. 34), lo cual sería indicativo de que la monocapa está completamente formada. Después de una medición inicial de la TEER (0 h) se añadieron 0.5 mg/ml de DMPA en el compartimento apical de los insertos, y se midió la TEER 1, 3, 6 y 12 h después. Se utilizó como control células con DMSO.

Las células AGS que no recibieron extracto bajaron en un 14% su TEER tras 12 h de incubación, mientras que las que recibieron 0.5 mg/ml de DMPA la disminuyeron 17%, por tanto no se considera que el extracto DMPA disminuya significativamente la permeabilidad de la monocapa celular (Fig. 34a). Esto coincide con el resultado de viabilidad celular, donde DMPA no la disminuye significativamente a 1h y habría que evaluar la viabilidad celular tras una incubación de 12 h para poder comparar ambos resultados a este tiempo.

Como se había mencionado anteriormente las células LLC-PK1 presentan uniones intercelulares más estables, por tanto la TEER de las células que no recibieron extracto se mantuvo estable a través del tiempo (0 a 12 h), mientras que la TEER de las células incubadas con extracto disminuyó hasta un 10% (Fig. 34b).

El extracto DMPA a 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ no alteró la integridad de la monocapa celular en ninguna de las dos líneas celulares evaluadas, por tanto no se considera citotóxico tras 12 horas de exposición, no obstante bajo el ensayo de MTT (Fig. 32), esa misma concentración inhibió el 31.5% de la viabilidad celular con 1 hora de exposición. Es necesario evaluar la citotoxicidad del extracto bajo otros métodos para poder confirmar este efecto.

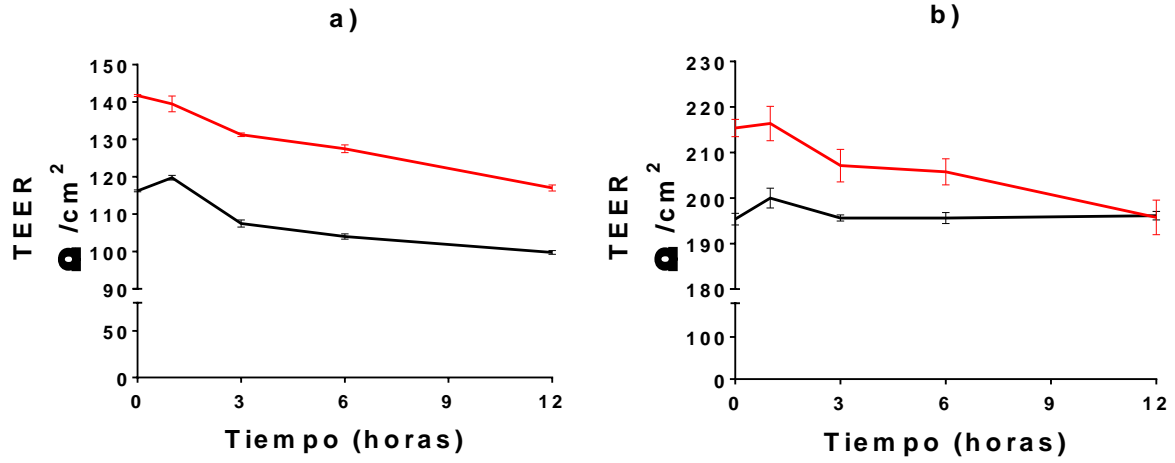


Figura 34. Efecto del extracto DMPA sobre la TEER. ---- 0 mg/ml. ---- 0.5 mg/ml. a) AGS b) LLC-PK1. Cada curva representa el promedio de tres replicas independientes por triplicado \pm error estándar de la media.

8. Conclusiones

El estudio permitió determinar que:

- Los extractos orgánicos de *P. hysterophorus* tienen actividad anti-*H. pylori* con CMI menores al metronidazol, convirtiéndolos en una fuente de compuestos antibacterianos contra esta bacteria. Mientras que los extractos acuosos tienen baja actividad anti-*H. pylori*.
- Los extractos de *P. hysterophorus* inhibieron la motilidad de manera dependiente de su actividad anti-*H. pylori*.
- La mayoría de los extractos inhibió parcialmente a la enzima ureasa y el extracto DR inhibió hasta el 74% de la actividad enzimática con una $IC_{50} = 136.4 \mu\text{g/ml}$.
- Los extractos orgánicos inhibieron parcialmente la adherencia de *H. pylori* y los extractos DMR y DMPA tuvieron actividades destacadas al inhibir hasta el 70% de la adherencia.
- Los extractos orgánicos afectaron significativamente la viabilidad celular a altas concentraciones tras 1 h de incubación y desde concentraciones bajas tras 24 h de incubación.

El fraccionamiento biodirigido de DMPA, por la actividad anti-adherente, permitió determinar que:

- Hay múltiples compuestos activos de diferente polaridad y por tanto, de estructura distinta.
- Los compuestos activos actúan sinérgicamente para inhibir la adherencia
- Se aisló e identificó una mezcla de partenina y coronopilina.

De manera conjunta para el extracto DMPA:

- El extracto DMPA tiene compuestos anti-adherentes cuyos receptores son SabA y BabA y otros compuestos con receptores desconocidos.
- El extracto DMPA no afecta significativamente la integridad del epitelio.

El presente trabajo contribuye a la validación del uso tradicional de *P. hysterophorus* en la etnomedicina Mexicana.

9. Perspectivas

Los resultados de este trabajo sirven como antecedente de plantear las siguientes perspectivas:

- Dada la alta actividad de los extractos HR, DR y DPA se sugiere su fraccionamiento y aislamiento de compuestos anti-*H. pylori*.
- Determinar si el efecto de los extractos HR, DR y DPA es bactericida o bacteriostático.
- Fraccionamiento y aislamiento de compuestos con actividad inhibitoria de la enzima ureasa a partir del extracto DR.
- Fraccionamiento de fracciones secundarias 6.13 y 6.14 con el fin de obtener compuestos con actividad anti-adherente y determinación de su mecanismo de acción.
- Caracterización fitoquímica del extracto DMPA y relación de actividad anti-adherente con compuestos marcadores.
- Evaluación del efecto de los extractos de *P. hysterothorus* sobre la integridad del epitelio.

10. Referencias

1. Afkhami, A., Norooz-Asl, R., 2008. Micelle-mediated extraction and spectrophotometric determination of ammonia in water samples utilizing indophenol dye formation. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 19, 1546-1552.
2. Águila, G. B., Meneses, C. R., González, M. L., Madrigal, L. E., Fernández, F. D., 2000. Extracto acuoso de escoba amarga. Estudio preliminar de sus propiedades. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 5, 123-124.
3. Aguilar, C., Camacho, S., Chino, P., Jáquez, P., López, M., 1994. Herbario medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información etnobotánica. Instituto Mexicano del Seguro Social, México.
4. Akazawa, Y., Isomoto, H., Matsushima, K., Kanda, T., Minami, H., Yamaguchi, N., Taura, N., Shiozawa, K., Ohnita, K., Takeshima, F., Nakano, M., Moss, J., Hirayama, T., Nakao, K. 2013. Endoplasmic reticulum stress contributes to *Helicobacter pylori* VacA-induced apoptosis. *PLoS One*. 8: e82322.
5. Akerele, O., 1988. Medicinal plants and primary health care: An agenda for action. *Fitoterapia*. 59, 355-363.
6. Allaker, R. P., Young, K. A., Hardie, J. M., Domizio, P., Meadows, N. J., 2002. Prevalence of *Helicobacter pylori* at oral and gastrointestinal sites in children: evidence for possible oral-to-oral transmission. *Journal of Medical Microbiology*. 51, 312-317.
7. Argueta, V.A., Cano, A.L.M., Rodarte, M.E., 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana, 1° edición. Instituto Nacional Indigenista, México.
8. Aspholm, M., Kalia, A., Ruhl, S., Schedin, S., Arnqvist, A., Lindén, S., Sjöström, R., Gerhard, M., Semino-Mora, C., Dubois, A., Unemo, M., Danielsson, D., Teneberg, S., Lee, W., Berg, D., Borén, T. 2006. *Helicobacter pylori* adhesion to carbohydrates. *Methods in Enzymology*. 417, 293-339.
9. Aspholm, Olfat, F., Nordén, J., Sondén, B., Lundberg, C., Sjöström, R., Altraja, S., Odenbreit, S., Haas, R., Wadström, T., Engstrand, L., Semino-Mora, C., Liu, H., Dubois, A., Teneberg, S., Arnqvist, A., Borén, T. 2006. SabA is the *H. pylori* hemagglutinin and is polymorphic in binding to sialylated glycans. *PLOS Pathogens*. 2, 989-1001.
10. Atherton, J. C., 2006. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease*. 1, 63-96.
11. Ayala, G., Galván-Portillo, M., Chihu, L., Fierros, G., Sánchez, A., Carrillo, B., Román, A., López-Carrillo, L., Silva-Sánchez, J., 2011. Resistance to antibiotics and characterization of *Helicobacter pylori* strains isolated from antrum and body from adults in Mexico. *Microbial Drug Resistance*. 17, 149-155.
12. Azevedo, N. F., Almeida, C., Cerqueira, L., Dias, S., Keevil, C. W., Vieira, M. J., 2007. Coccoid form of *Helicobacter pylori* as a morphological

- manifestation of cell adaptation to environment. *Applied and Environmental Microbiology*. 73, 3423-3427.
13. Bajwa, R., Khalid, A., Shahid, C. T., 2003. Antifungal activity of allelopathic plant extracts III: Growth response of some pathogenic fungi to aqueous extract of *Parthenium hysterophorus*. *Pakistan Journal of Plant Pathology*. 2, 145-156.
 14. Beil, W., Kilian, P., 2007. EPs®, an extract from *Pelargonium sidoides* roots inhibits adherence of *Helicobacter pylori* to gastric epithelial cells. *Phytomedicine*. 14, 5-8.
 15. Belz, R. G., 2008. Stimulation versus inhibition- Bioctivity of parthenin, a phytochemical from *Parthenium hysterophorus* L. *Dose-Response*. 6, 80-96.
 16. Blaser, M. J., 2008. Disappearing microbiota: *Helicobacter pylori* protection against esophageal adenocarcinoma. *Cancer Prevention Research*. 1 308-311.
 17. Brown, L. M., Thomas, T. L., Ma, J. L., Chang, Y. S., You, W. C., Liu, W. D., Zhang, L., Gail, M. H., 2001. *Helicobacter pylori* infection in rural China: exposure to domestic animals during childhood and adulthood. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 33, 686-691.
 18. Bucciarelli, A., Skliar, M. I., 2007. Plantas medicinales de Argentina con actividad gastroprotectora. *Ars Pharmaceutica*. 48, 361-369.
 19. Bye, R. A., Linares, E., Flores, P., 1992. Selección de plantas medicinales de México. 1ª edición. Noriega Editores. México. 125 p.
 20. Cañigual, S., Vila, R., 2003. La fitoterapia racional. En: Vanaclocha, B., Cañigual, S., *Fitoterapia: vademécum de prescripción*, 4ª edición. Masson. España. 15-27.
 21. Caraballo, A., Caraballo, B., Rodríguez, A., 2004. Preliminary assessment of medicinal plants used as antimalarials in the southeastern Venezuelan amazon. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 37, 186-188.
 22. Cassel-Beraud, A. M., Le-An, J., Mouden, J. C., Andriantsoa M., Andriantsiferana, R., 1991. Preliminary study of the prevalence of *Helicobacter pylori* in Tananarive, Madagascar and the bacterial activity in vitro of 13 Malagasy medicinal plants on this germ. *Archives de L'Institute Pasteur de Madagascar*. 59, 9-23.
 23. Castillo-Juárez, I., Romero, I., 2007. Plantas con actividad anti-*Helicobacter pylori*: una revisión. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 80, 35-62.
 24. Castillo-Juárez, I., González, V., Jaime-Aguilar, H., Martínez, G., Linares, E., Bye, R., Romero, I., 2009. Anti-*H pylori* activity of plants used in mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*. 122, 402-405.
 25. Celli, J.P., Turner, B.S., Afdhal, N.H., Keates, S., Ghiran, I., Kelly, C.P., Ewoldt, R.H., McKinley, G.H., So, P., Erramilli, S., Bansil, R. 2009. *Helicobacter pylori* moves through mucus by reducing mucin viscoelasticity. *Proceedings of the National Academy of Science*. 106, 14321-14326.
 26. Chiurillo, M. A., Moran, Y., Cañas, M., Valderrama, E., Granda, N., Sayegh, M., Ramírez, J. L., 2013. Genotyping of *Helicobacter pylori* virulence-associated genes shows high diversity of strains infecting patients in

- Western Venezuela. *International Journal of Infectious Diseases*. 17, 750-756.
27. Costa, A.M., Leite, M., Seuca R., Figueiredo, C., 2013. Adherens junctions as targets of microorganisms: A focus on *Helicobacter pylori*. *FEBS Letters*. 587, 259-265.
 28. CSIR, 2001. The Wealth of India. First Supplementary Series (Raw Materials) Vol. 7. Ci. Cy. National Institute of Science Communication, CSIR. India.
 29. Das, B., Venkataiah, B., Kashinatham, A., 1999. (+)-Syringaresinol from *Parthenium hysterophorus*. *Fitoterapia*. 70, 101-102.
 30. Das, B., Saidi, R. V., Krishmaiah, M., Sharma, A. V. S., Ravi, K. K., Venkateswara, R. J., Sridhar, V., 2007. Acetylated pseudoguaianolides from *Parthenium hysterophorus* and their cytotoxic activity. *Phytochemistry*. 68, 2029-2034.
 31. Das, B., Ravinder, R. K., Ravinkanth, B., Subrahmanya, S. A. V., Sridhar, B., 2008. The new pseudoguaianolides from the flowers of *Parthenium hysterophorus*. *Helvetica Chimica Acta*. 91, 1137-1143.
 32. Das, B., Jangili, P., Srilatha, M., Kashanna, J., Das, R., 2013. Pseudoguaianolides from a collection of the flowers of *Parthenium hysterophorus* Linn. (Compositae). *Signpost Open Access Journal of Organic and Biomolecular Chemistry*. 1, 195-200.
 33. De Francesco, V., Ierardi, E., Hassan, C., Zullo, A., 2012. *Helicobacter pylori* therapy: Present and future. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*. 3, 68-73.
 34. De Francesco, V., Hassan, C., Ridola, L., Giorgio, F., Ierardi, E., Zullo, A., 2014. Sequential, concomitant and hybrid first-line therapies for *Helicobacter pylori* eradication: a prospective randomized study. *Journal of Medical Microbiology*. 63, 748-752.
 35. Dore, M. P., Sepulveda, A. R., El-Zimaity, H., Yamaoka, Y., Osato, M. S., Mototsugu, K., Nieddu, A. M., Realdi, G., Graham, D. Y., 2001. Isolation of *Helicobacter pylori* from sheep- implications for transmissions to humans. *American Journal of Gastroenterology*. 96, 1396-1401.
 36. Dossumbekova, A., Prinz, C., Mages, J., Lang, R., Kusters, J. G., van Vliet, A. H., Reindl, W., Backert, S., Saur, D., Schmid, R. M., Rad, R., 2006. *Helicobacter pylori* HopH (OipA) and bacterial pathogenicity: genetic and functional genomic analysis of hopH gene polymorphisms. *The Journal of Infectious Diseases*. 194, 1346-1355.
 37. El Nujumi, A.M., Dorrian, C.A., Neithercut, W.D., McColl, K.E.L., 1991. Effect of inhibition of *Helicobacter pylori* urease activity by acetohydroxamic acid on serum gastrin in duodenal ulcer subjects. *Gut*. 32, 866-870.
 38. Enroth, H., Engstrand, L., 1995. Immunomagnetic separation and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in water and stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 33, 2162-2165.
 39. Enroth, H., Wreiber, K., Rigo, R., Risberg, D., Uribe, A., Engstrand, L., 1999. *In vitro* aging of *Helicobacter pylori*: changes in morphology, intracellular composition and surface properties. *Helicobacter*. 4, 7-16.

40. Escobedo-Hinojosa, W. I., Díaz del Carpio, J., Palacios-Espinosa, J. A., Romero, I., 2012. Contribution to the ethnopharmacological and anti-*Helicobacter pylori* knowledge of *Cyrtocarpa procera* Kunth (Anacardiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 143, 363-371.
41. Espinosa, R.J.P., 2010. Efecto antibiótico de los extractos de *Parthenium hysterophorus* sobre *Helicobacter pylori*. Tesis de Licenciatura Biología. Fac de Ciencias, UNAM, 88 p.
42. Espinosa-Rivero, J., Rendón-Huerta, E., Romero, I., 2015. Inhibition of *Helicobacter pylori* growth and its colonization factors by *Parthenium hysterophorus* extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 174, 253-260.
43. Ferguson Jr., D. A., Li, C., Patel, N. R., Mayberry, W. R, Chi, D. S., Thomas, E., 1993. Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva. *Journal of Clinical Microbiology*. 31, 2802-2804.
44. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, S., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., Bray, F., 2014. Cancer incidence and mortality worldwide. International Agency for Research on Cancer. <http://globocan.iarc.fr>. Acceso: 16/04/2016.
45. Fernández-Calienes, V.A., Mendiola, M.J., Sculli, L.R., Gutiérrez, G.Y., Acuña, R.D., Abreu, P.J., 2010. *In vitro* antimalarial activity and cytotoxicity of some selected Cuban medicinal plants. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 52, 197-201.
46. Garza-González, E., Pérez-Pérez, G. I., Alani-Aguilar, O., Tijerina-Menchaca, R., Maldonado-Garza, H. J., Bosque-Padilla, F. J., 2002. Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* strains isolated from northeastern Mexico. *Journal of Chemotherapy*. 14, 342-345.
47. Gerwitz, A. T, Yu, Y., Krishna, U. S., Israel, D. A., Lyons, S. L., Peek, M. R., 2004. *Helicobacter pylori* flagellin evades Toll-like receptor 5-mediated innate immunity. *The Journal of Infectious Diseases*. 189, 1914-20.
48. Gustafson, J., Welling, D., 2010. "No acid, no ulcer"- 100 years later: a review of the history of ulcer disease. *Journal of the American College of Surgeons*. 210, 110-116.
49. Hegarty, J. P., Dowd, M. T., Baker, K. H., 1999. Occurrence of *Helicobacter pylori* in surface water in the United States. *Journal of Applied Microbiology*. 87, 697-701.
50. Hessey, S. J., Spencer, J., Wyatt, J. I., Sobala, G., Rathbone, B. J., Axon, A. T. R., Dixon, M. F., 1990. Bacterial adhesion and disease activity in *Helicobacter* associated chronic gastritis. *Gut*. 31, 134-138.
51. Hisatsune, J., Nakayama, M., Isomoto, H., Kurazono, H., Mukaida, M., Mukhopadhyay, A. K., Azuma, T., Yamaoka, Y., Sap, J., Yamasaki, E., Yahiro, K., Moss, J., Hirayama, T., 2008. Molecular characterization of *Helicobacter pylori* VacA induction of IL-8 in U937 cells reveals a prominent role for p38MAPK in activating transcription factor-2, cAMP response element binding protein, and NF-κB activation. *The Journal of Immunology*. 180, 5017-5027.
52. Huesca, M., Goodwin, A., Bhagwansingh, A., Hoffman, P., Lingwood, C. A., 1998. Characterization of an acidic-pH-inducible stress protein (hsp70), a

- putative sulfatide binding adhesion, from *Helicobacter pylori*. Infection and Immunity. 66, 4061-4067.
53. Hwang, J. J., Lee, D. H., Lee, A. R., Yoon, H., Shin, C. M., Park, Y. S., Kim, N., 2015. Fourteen- vs seven-day bismuth- based quadruple therapy for second-line *Helicobacter pylori* eradication. World Journal of Gastroenterology. 21. 8132- 8139.
 54. IARC, 1994. Schistosomes, Liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human. World Health Organization 61. 270 p.
 55. Ilver, D., Arnqvist, A., Ogren, J., Frick, I. M., Kersulyte. D., Incecik, E. T., Berg, D. E., Covacci, A., Engstrand, L., Boren, T., 1998. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. Science. 279, 373-377.
 56. Isomoto, H., Moss, J., Hirayama, T., 2010. Pleiotropic actions of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, VacA. The Tohoku Journal of Experimental Medicine. 220, 3-14.
 57. Jones, A. C., Logan, R. P., Foyes, S., Cockayne, A., Wren, B. W., Penn, C. W., 1997. A flagellar sheath protein of *Helicobacter pylori* is identical to HpaA, a putative N-acetylneuraminylactose-binding hemagglutinin, but is not an adhesin for AGS cells. Journal of Bacteriology. 17, 5643-5647.
 58. Kabir, S., 2004. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in feces and saliva by polymerase chain reaction: a review. Helicobacter. 9, 115-123.
 59. Kahan, M.S., Ahmad, S., 2008. Pharmacognostical, phytochemical, biological and tissue culture studies on *Parthenium hysterophorus* Linn.: a review. The Internet Journal of Alternative Medicine. 6, 1-5.
 60. Kamiya, S., Yamaguchi, H., Osaki, T., Taguchi, H., 1998. A virulence factor of *Helicobacter pylori*: role of heat shock protein in mucosal inflammation after *H. pylori* infection. Journal of Clinical Gastroenterology. 27, 35-39.
 61. Khaliq, A., Aslam, F., Matloob, A., Hussain, S., Tanveer, A., Alsaadawi, I., Geng, M., 2015. Residual phytotoxicity of *Parthenium*: Impact on some winter crops, weeds and soil properties. Ecotoxicology and Environmental Safety. 122, 352-359.
 62. Kidd, M., Modlin, I.M., 1998. A century of *Helicobacter pylori*. Digestion. 59, 1-15.
 63. Kirschner, D. E., Blaser, M. J., 1995. The dynamics of *Helicobacter pylori* infection of the human stomach. Journal of Theoretical Biology. 176, 281-290.
 64. Kobayashi, Y., Okazaki, K., Murakami, K., 1993. Adhesion of *Helicobacter pylori* to gastric epithelial cells in primary cultures obtained from stomachs of various animals. Infection and Immunity. 61, 4058-4063.
 65. Konturek, J. W., 2003. Discovery by Jaworski of *Helicobacter pylori* and its pathogenic role in peptic ulcer, gastritis and gastric cancer. Journal of Physiology and Pharmacology. 54, 23-41.
 66. Kusters, J. G., van Vliet, A. H., Kuipers, E. J., 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Clinical Microbiology Reviews. 19, 449-490.
 67. Kumar, S., Chashoo, G., Saxena, A.K., Pandey, A.K., 2013. *Parthenium hysterophorus*: a probable source of anticancer, antioxidant and anti-HIV agents. Biomed Research International. 2013, 1-11.

68. Lai, C.H., Fang, S.H., Rao, Y.K., Geethangili, M., Tang, S.H., Lin, Y.J., Hung, C.H., Wang, W.C., Tzeng, Y.M., 2008. Inhibition of *Helicobacter pylori*-induced inflammation in human gastric epithelial AGS cells by *Phyllanthus urinaria* extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 118, 522-526.
69. Lee, J.H., Park, E.K., Uhm, C.S., Chung, M.S., Kim, K.H., 2004. Inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric adenocarcinoma epithelial cells by acidic polysaccharides from *Artemisia capillaris* and *Panax ginseng*. *Planta Medica*. 70, 615-619.
70. Lee, J.H., Shim, J.S., Chung, M.S., Lim, S.T., Kim, K.H., 2009. *In vitro* anti-adhesive activity of green tea extract against pathogen adhesion. *Phytotherapy Research*. 23, 460-466.
71. Lertsetharn, P., Ottemann, K. M., Hendrixson, D. R., 2011. Motility and chemotaxis in *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Annual review of microbiology*. 65, 389-410.
72. Liu, T.W., Ho, C.W., Huang, H. H., Chang, S. M., Papat, S. D., Wang, Y. T., Wu, M. S., Chen, Y. J., Lin, C. H., 2009. Role for alpha-L-fucosidase in the control of *Helicobacter pylori*-infected gastric cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106, 14581-14586.
73. Lopes, D., Nunes, C., Martins, M.C.L., Sarmiento, B., Reis, S., 2014. Eradication of *Helicobacter pylori*: Past, present and future. *Journal of Controlled Release*. 189, 169-186.
74. López, V. Y., Rangel, F., Sigfrido, M., Calva, J. J., 1998. Resistencia a antimicrobiano de *Helicobacter pylori* en un centro de referencia infectológico. *Revista de Investigación Clínica*. 50, 19-24.
75. Luck, J. M., Seth, T. N., 1925. The physiology of gastric urease. *Biochemical Journal*. 19, 357-365.
76. Madigan, M.T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., Stahl, D. A., 2015. *Brock biology of microorganisms*. 14^a edición. Pearson. EUA. 1006 p.
77. Magalhaes, A., Nazri, M., Reis, C., 2010. Sweet receptors mediate the adhesion of gastric pathogen *Helicobacter pylori*: glycoproteomic strategies. *Expert Review of Proteomics*. 7, 307-310.
78. Magaña, A.M.A., Gama, C.L.M., Mariaca, M.R., 2010. El uso de las plantas medicinales en las comunidades Maya-Chontales de Nacajuca, Tabasco, México. *Polibotánica*. 29, 213-262.
79. Maharjan, S., Babu, S. B., Kumar, J. P., 2007. Allelopathic effects of aqueous extract of leaves of *Parthenium hysterophorus* L. on seed germination and seedling growth of some cultivated and wild herbaceous species. *Scientific World*. 5, 33-39.
80. Maishi, A. I., Shoukat-Ali, P. K., Chaghtal, S. A., Khan, G., 1998. A proving of *Parthenium hysterophorus*, L. *British Homoeopathic Journal*. 87, 17-21.
81. Malakordi, E., Manoharan, A., 2013. Study on antibacterial activity of *Parthenium hysterophorus* L. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 5, 134
82. Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C. A., Atherton, J., Axon. A. T., Bazzoli, F., Gensini, G. F., Gisbert, J. P., Graham, D. Y., Rokkas, T., El-Omar, E. M., Kuipers, E. J., European *Helicobacter* Study Group, 2012.

- Management of *Helicobacter pylori* infection- the Maastricht IV/Florence Consensus Report. Gut. 61, 646-664.
83. Martini, S., D'Addario, C., Colacevich, A., Focardi, S., Borghini, F., Santucci, A., Figura, N., Rossi, C., 2009. Antimicrobial activity against *H. pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds. Int J Antimicrob Agents. 34, 50-59.
 84. Martínez, M., 1969. Las plantas medicinales de México. 5ª edición. Botas. México. 657 p.
 85. Matongo, F., Nwodo, U.U., 2014. *In vitro* assessment of *Helicobacter pylori* ureases inhibition by honey fractions. Archives of Medical Research. 45, 540-546.
 86. Mears, J.A., 1980. The flavonoids of *Parthenium* L. Journal of Natural Products. 43, 708-716.
 87. Ministerio de Salud Pública de Cuba, 1993. Fitomed II. Plantas medicinales. Ciencias Médicas. Cuba.
 88. Missouri Botanical Garden, 2016. <http://www.tropicos.org/Name/2701101>. Consulta interactiva de datos: 18 de mayo de 2016.
 89. Miszczyk, E., Rudnicka, K., Moran, A., Fol, M., Kowalewicz-Kubalt, M., Druszczyńska, M., Matusiak, A., Walencka, M., Rudnicka, W., Chmiela, M., 2012. Interaction of *Helicobacter pylori* with C-type lectin dendritic cell-specific ICAM grabbing nonintegrin. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2012, 1-10.
 90. Miyazawa, M., Utsunomiya, H., Inada, K., Yamada, T., Okuno, Y., Tanaka, H., Tatematsu, M., 2006. Inhibition of *Helicobacter pylori* motility by (+)-syringaresinol from Unripe Japanese Apricot. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 29, 172-173.
 91. Mobley, H. L. T., Island, M. D., Hausinger, R. P., 1995. Molecular biology of microbial ureases. Microbiological Reviews. 59, 451-480.
 92. Mobley, H. L. T., 2001. Urease en: Mobley, H. L. T., Mendz, G. L., Hazell, S. L. *Helicobacter pylori*: Physiology and genetics. 1ª edición. ASM Press. E.U.A.
 93. Modolo, L.V., de Souza, A.X., Horta, L.P., Araujo, D.P., Fátima, A. 2015. An overview on the potential of natural products as ureases inhibitors: A review. Journal of Advanced Research. 6, 34-44.
 94. Monteiro, M. A., Chan, K. H., Rasko, D. A., Taylor, D. E., Zheng, P. Y., Appelmelk, B. J., Wirth, H. P., Yang, M., Blaser, M. J., Hynes, S. O., Moran, A. P, Perry, M. B., 1998. Simultaneous expression of type 1 and type 2 Lewis blood group antigens by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides. Molecular mimicry between *H. pylori* lipopolysaccharides and human gastric epithelial cell surface glycoforms. The Journal of Biological Chemistry. 273, 11533-11543.
 95. Mossman, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods. 65, 55-63.
 96. Mukherjee, B., Chatterjee, M., 1993. Antitumor activity of *Parthenium hysterophorus* and its effect in the modulation of biotransforming enzymes in transplanted murine leukemia. Planta Medica. 59, 513-516.

97. Narasimham, T. R., Keshava, M. B. S., Harindranath, N., Subba, R. P. V., 1984. Characterization of a toxin from *Parthenium hysterophorus* and its mode of excretion in animals. *Journal of Biosciences*. 6, 729-738.
98. Nobata, K., Ina, K., Otha, M., Kawamura-Sato, K., Tsuzuki, T., Ando, T., Kusugami, K., 2002. Lower concentrations of clarithromycin suppress urease activity, motility, and binding to gastric epithelial cells in *Helicobacter pylori* isolates. *Digestive and Liver Disease*. 34, 489-497.
99. O'Connor, A., Gisbert, J.P., O'Morain, C., Ladas, S., 2015. Treatment of *Helicobacter pylori* infection 2015. *Helicobacter*. 20, 54-61.
100. Odenbreit, S., Till, M., Hofreuter, D., Faller, G., Haas, R., 1999. Genetic and functional characterization of the alpAB gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Molecular Microbiology*. 31, 1537-1548.
101. Odenbreit, S., Swoboda, K., Barwig, I., Ruhl, S., Borén, T., Koletzko, S., Haas, R., 2009. Outer membrane protein expression profile in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Infection and Immunity*. 77, 3782-3790.
102. O'Mahony, R., Al-Khtheeri, H., Weerasekera, D., Fernando, N., Vaira, D., Holton, J., Basset, C., 2005. Bactericidal and anti-adhesive properties of culinary and medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastroenterology*. 11, 7499-7507.
103. Organización Mundial de Gastroenterología, 2010. *Helicobacter pylori* en vías de desarrollo. Guías prácticas de la Organización Mundial de Gastroenterología. 14 p.
104. Organización Mundial de la Salud. 2000. Situación Reglamentaria de los medicamentos: una reseña mundial. OMS. 52 p.
105. O'Toole, P. W., Lane, M. C., Porwollik, S., 2000. *Helicobacter pylori* motility. *Microbes and Infection*. 2, 1207-1214.
106. Oudhia, P., 2001. Medicinal uses of Congress weed *Parthenium hysterophorus* L: A review. Society for *Parthenium hysterophorus* L. Management (SOPAM), Raipur, India.
107. Pandey, D. K., 1996. Phytotoxicity of sesquiterpene lactone parthenin on aquatic weeds. *Journal of Chemical Ecology*. 22, 151-160.
108. Palacios-Espinosa, J.F., Arroyo-García, O., García-Valencia, G., Linares, E., Bye, R., Romero, I., 2014. Evidence of the anti-*Helicobacter pylori*, gastroprotective and anti-inflammatory activities of *Cuphea aequipetala* infusion. *Journal of Ethnopharmacology*. 151, 990-998.
109. Parsonnet, J., Shmueli, H., Haggerty, T., 1999. Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. *Journal of the American Medical Association*. 282, 2240-2245.
110. Pastene, E., Speisky, H., García, A., Moreno, J., Troncoso, M., Figueroa, G., 2010. *In vitro* and *in vivo* effects of apple peel polyphenols against *Helicobacter pylori*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58, 7172-7179.
111. Patel, V. S., Chitra, V., Lakshmi, P. P., Krishnaraju, V., 2008. Hypoglycemic effect of aqueous extract of *Parthenium hysterophorus* L. in normal and alloxan induced diabetic rats. *Indian Journal of Pharmacology*. 40, 183-185.

112. Patel, S., 2011. Harmful and beneficial aspects of *Parthenium hysterophorus*: an update. 3 Biotech. 1, 1-9.
113. Paulo, L., Oleastro, M., Gallardo, E., Queiroz, J. A., Domingues, F., 2011. Anti-*Helicobacter pylori* and urease inhibitory activities of resveratrol and red wine. Food Research International. 44, 964-969.
114. Peck, B., Ortkamp, M., Diehl, K. D., Hundt, E., Knapp, B., 1999. Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*. Nucleic Acids Research. 27, 3325-3333.
115. Queralt, N., Bartolome, R., Araujo, R., 2005. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human faeces and water with different levels of faecal pollution in the north-east of Spain. Journal of Applied Microbiology. 98, 889-895.
116. Raghu, J.D., Veerashekar, T., Kuppast, I.J., Dharshan, S., Ravi, M.C., 2014. A review on *Parthenium hysterophorus* Linn. International Journal of Universal Pharmacy and Biosciences. 3, 110-120.
117. Ramos, A., Rivero, R., Visozo, A., Piloto, J., García, A., 2002. Parthenin, a sesquiterpene lactone of *Parthenium hysterophorus* L. is a high toxicity clastogen. Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 514, 19-27.
118. Rodríguez, E., 1977. Ecogeographic distribution of secondary constituents in *Parthenium* (compositae). Biochemical Systematics and Ecology. 5, 207-218.
119. Rodríguez-Pérez, M., Martínez, J. M., Rivero, L. R., Álvarez, H. M. H., Valdez, A. F. C., Rodríguez, D. A., Lizama, R. S., Payrol, J. A., 2006. Evaluación de la actividad antimalárica de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional cubana. Revista de Ciencias Farmaceuticas Básica e Aplicada. 27, 197-205.
120. Rossez, Y., Gosset, P., Boneca, I. G., Magalhães, A., Ecobichon, C., Reis, C. A., Cieniewski-Bernard, C., Chevalier, C. M. J., Léonard, R., Maes, E., Sperandio, B., Slomianny, C., Sansonetti, P. J., Michalski, J. C., Robbe-Masselot, C., 2014. The LacdiNac-specific adhesin LabA mediates adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa. The Journal of Infectious Diseases. 210, 1286-1295.
121. Ruesch, H., Mabry, T. J., 1969. The isolation and structure of tetraeurin A, a new pseudoguaianolide from *Parthenium alpinum* var. tetraeuris (Compositae). Tetrahedron. 25, 805-811.
122. Sachs, G., Weeks, D. L., Wen, Y., Marcus, E. A., Scott, D. R., Melchers, K., 2005. Acid acclimation by *Helicobacter pylori*. Physiology. 20, 429-438.
123. Samy, R.P., Gopalakrishnakone, P., 2010. Therapeutic potential of plants as anti-microbials for drug discovery. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 7, 283-294.
124. Saucedo, H. Y., Bravo, S. L., González, B. M. M., Torres, G. L., Jorge, R. E., González, M. D., Polin, G. L., Dhooche, L., Theunis, M., Pieters, L., Apers, S., 2011. Determination of parthenin in *Parthenium hysterophorus* L. by means of HPLC-UV: Method development and validation. Phytochemistry Letters. 4, 134-137.
125. Schreiber, S., Konradt, M., Groll, C., Scheid, P., Hanauer, G., Werling, H. O., Josenhans, C., Suerbaum, S., 2004. The spatial orientation of

- Helicobacter pylori* in the gastric mucus. Proceedings of the National Academy of Sciences. 101, 5024-5029.
126. Secretaría de Salud. 2011. Profilaxis, diagnóstico y tratamiento de la gastritis aguda (erosiva) en los tres niveles de atención. En: www.cenetec.salud.gob.mx/interior/gpc.html. Acceso: 16/04/2016.
 127. Secretaría de Salud. DGEPI. Anuario de morbilidad 1984-2014. Consulta interactiva de datos: 8 de abril de 2016.
 128. Senkovich, O. A., Yin, J., Ekshyyan, V., Conant, C., Traylor, J., Adegboyega, P., McGee, D. J., Rhoads, R. E., Slepnev, S., Testerman, T. L., 2011. *Helicobacter pylori* AlpA and AlpB bind host laminin and influence gastric inflammation in gerbils. *Infection and Immunity*. 79, 3106-3116.
 129. Shah, B. A., Chib, R., Gupta, P., Kumar, S. V., Koul, S., Singh, A. S., Nargotra, A., Sharma, S., Pandey, A., Bani, S., Purnima, B., Chandra, T. S., 2009. Saponins as novel TNF- α inhibitors: isolation of saponins and a non-pseudoguaianolide from *Parthenium hysterophorus*. *Organic and Biomolecular Chemistry*. 7, 3230-3235.
 130. Shen, M. C., Rodríguez, E., Keer, K., Mabry, T. J., 1976. Flavonoids of four species of *Parthenium* (Compositae). *Phytochemistry*. 15, 1045-1047.
 131. Sheu, B. S., Odenbreit, S., Hung, K. H., Liu, C. P., Sheu, S. M., Yang, H. B., Wu, J. J., 2006. Interaction between host gastric sialyl-Lewis X and *H. pylori* SabA enhances *H. pylori* density in patients lacking gastric Lewis B antigen host gastric sialyl-Lewis X and *H. pylori* SabA. *The American Journal of Gastroenterology*. 101, 36-44.
 132. Shi, D., Liu, Y., Liu, W., Gu, Z., 2011. Inhibition of urease by extracts derived from 15 Chinese medicinal herbs. *Pharmaceutical Biology*. 7, 752-755.
 133. Siddhardha, B., Ramakrishna, G., Basaveswara, R.M.V., 2012. *In vitro* antibacterial efficacy of a sesquiterpene lactone, parthenin from *Parthenium hysterophorus* L. (Compositae) against enteric bacterial pathogens. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*. 2, 206-209.
 134. Srinivasan, B., Kolli, A.R., Esch, M.B., Abaci, H.E., Shuler, M.L., Hickman, J.J., 2015. TEER Measurement techniques for *in vitro* barrier model systems. *Journal of Laboratory Automation*. 20, 107-121.
 135. Strömqvist, M., Falk, P., Bergström, S., Hansson, L., Lönnnerdal, B., Normark, S., Hernell, O., 1995. Human milk κ -casein and inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucosa. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 21, 288-296.
 136. Sycuro, L. K., Pincus, Z., Gutierrez, K. D., Biboy, J., Stern, C. A., Vollmer, W., Salama, N. R., 2010. Peptidoglycan crosslinking relaxation promotes *Helicobacter pylori*'s helical shape and stomach colonization. *Cell*. 141, 822-833.
 137. Talakal, T. S., Dwivedi, S. K., Sharma, S. R., 1995. In vitro and in vivo therapeutic activity of *Parthenium hysterophorus* against *Trypanosoma evansi*. *Indian Journal of Experimental Biology*. 33, 894-896.
 138. Teneberg, S., Miller-Podraza, H., Lampert, H. C., Evans Jr., D. J., Evans, D. G., Danielsson, D., Karlsson, K. A., 1997. Carbohydrate binding

- specificity of the neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori*. The Journal of Biological Chemistry. 272, 19067-19071.
139. Tenorio, L.A., 2006. En: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/parthenium-hysterophorus/imagenes/inflorescencia-acercamiento.jpg>
 140. Testerman, T. L., McGee, D. J., Mobley, H. L. T., 2001. Adherence and Colonization en: Mobley, H. L. T., Mendz, G. L., Hazell, S. L. *Helicobacter pylori*: Physiology and genetics. 1ª edición. ASM Press. E.U.A.
 141. The Angiosperm Phylogeny Group. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APGII. Botanical Journal of the Linnean Society. 141, 399-346.
 142. Tohidpour, A., 2016. CagA-mediated pathogenesis of *Helicobacter pylori*. Microbial Pathogenesis. 93, 44-55.
 143. Torres, J., Camorlinga, M., Pérez-Pérez, G., Madrazo-De la Garza, A., Dehesa, M., González-Valencia, G., Muñoz, O., 2001. Increasing multidrug resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from children and adults in Mexico. Journal of Clinical Microbiology. 39, 2677-2680.
 144. Torres J., López L., Lazcano E., Camorlinga, M., Flores, L., Muñoz, O., 2005. Trends in *H pylori* infection and gastric cancer in Mexico. Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention. 14, 1874-1877.
 145. Umamaheshwari, R.B., Jain, S., Bahadra, D., Jain, N.K., 2003. Floating microspheres bearing acetohydroxamic acid for the treatment of *Helicobacter pylori*. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 55, 1607-1613.
 146. Umamaheshwari, R. B., Jain, N.K., 2004. Receptor-mediated targeting of lipobeads bearing acetohydroxamic acid for eradication of *Helicobacter pylori*. Journal of Controlled Release. 99, 27-40.
 147. Vakil, N., Megraud, F., 2007. Eradication therapy for *Helicobacter pylori*. Gastroenterology. 133, 985-1001.
 148. Venkataiah, B., Ramesh, C., Ravindranath, N., Das, B., 2003. Charminerone, a seco-pseudoguaianolide from *Parthenium hysterophorus*. Phytochemistry. 63, 383-386.
 149. Villarreal, Q. J. A., 1983. Malezas de Buenavista, Coahuila, Saltillo. 1ª edición. Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro". México. 271 p.
 150. Villaseñor, J. L., Espinosa, G. F. J., 1998. Catálogo de Malezas de México. 1ª edición. Universidad Nacional Autónoma de México y Fondo de Cultura Económica. México. 449 p.
 151. Villate, G. M., Mederos, M. D., Rodríguez, Y., Chala, R. S., 2006. Efecto biológico de extractos de hojas, flores y raíces de *Parthenium hysterophorus* L. sobre larvas de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith. CIGET Pinar del Río. 8, <http://www.ciget.pinar.cu/Revista/No.2006-1/efecto.htm>.
 152. Walz, A., Odenbreit, S., Mahdavi, J., Borén, T., Ruhl, S., 2005. Identification and characterization of binding properties of *Helicobacter pylori* by Esglycoconjugate arrays. Glycobiology. 15, 700-708.
 153. Warren, J., R., Marshall, B., 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. The Lancet. 312, 1273-1275.
 154. Weatherburn, M.W., 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. Analytical Chemistry. 39, 971-973.

155. Weeks, D. L., Eskandari, S., Scott, D. R., Sachs, G., 2000. A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science*. 287, 482-485.
156. WHO. 1978. The promotion and development of traditional medicine. Technical Report Series. Report of a WHO meeting. Geneva. 44 p.
157. Wissesombat, S., Metthai, C., 2014. Prevalence of *Helicobacter pylori* cagA genotype among dyspeptic patients in Southern Thailand. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. 3, 317-319.
158. Wittschier, N., Faller, G., Hensel, A., 2009. Aqueous extracts and polysaccharides from Liquorice roots (*Glycyrrhiza glabra* L.) inhibit adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa. *Journal of Ethnopharmacology*. 125, 218-223.
159. Xu, C., Ruan, X.M., Li, H.S., Guo, B.X., Ren, X.D., Shuang, J.L., Zhang, Z. 2010. Anti-adhesive effect of an acidic polysaccharide from *Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.) Berger on the binding of *Helicobacter pylori* to the MKN-45 cell line. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 62, 1753-1759.
160. Yamaguchi, H., Osaki, T., Kurihara, N., Taguchi, H., Hanawa, T., Yamamoto, T., Kamiya, S., 1997. Heat-shock protein 60 homologue of *Helicobacter pylori* is associated with adhesion of *H. pylori* to human gastric epithelial cells. *Journal of Medical Microbiology*. 46, 825-831.
161. Yamaoka, Y., Kodama, T., Gutierrez, O., Kim, J. G., Kashima, K., Graham, D. Y., 1999. Relationship between *Helicobacter pylori* *iceA*, *cagA*, and *vacA* status and clinical outcome: studies in four countries. *Journal of Clinical Microbiology*. 37, 2274-2279.
162. Yamaoka, Y., Kikuchi, S., el-Zimaity, H. M., Gutierrez, O., Graham, D. Y., 2002. Importance of *Helicobacter pylori* *oipA* in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. *Gastroenterology*. 123, 414-424.
163. Yoshiyama, H., Nakazawa, T., 2000. Unique mechanism of *Helicobacter pylori* for colonizing the gastric mucus. *Microbes and Infection*. 2, 55-60.
164. Yoshiyama, H., Nakamura, H., Okamoto, T., Okita, K., Nakazawa, T., 2000. A novel *in vitro* effect of the mucosal protective agent sofalcone-inhibition of chemotactic motility in *Helicobacter pylori*. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 14, 230-236.
165. Zamora, C. L., 2015. Efecto antiurolítico y diurético de los extractos orgánicos y acuoso de *Ipomoea pes-crapae* (L.) R. Br. "Riñonina" en ratas Wistar. Tesis de Licenciatura Biología. Fac de Ciencias, UNAM, 74 p.

11. Publicaciones.

1. **Espinosa-Rivero, J.**, Rendón-Huerta, E., Romero, I., 2015. Inhibition of *Helicobacter pylori* growth and its colonization factors by *Parthenium hysterophorus* extracts. Journal of Ethnopharmacology. 174, 253-260.
2. **Espinosa Rivero, J.**, Romero Álvarez, I., 2014. A 30 años del descubrimiento de *Helicobacter pylori*. Uso de plantas medicinales como fuente de terapias. Mensaje Bioquímico. 41, 85-102.



Inhibition of *Helicobacter pylori* growth and its colonization factors by *Parthenium hysterophorus* extracts



Jazmín Espinosa-Rivero^a, Erika Rendón-Huerta^b, Irma Romero^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, C.P. 04510 México, D.F., Mexico

^b Laboratorio Inmunobiología, Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, C.P. 04510 México, D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 April 2015

Received in revised form

30 July 2015

Accepted 18 August 2015

Available online 20 August 2015

Keywords:

Helicobacter pylori

Parthenium hysterophorus

Medicinal plant

Adherence

Urease

Motility

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Parthenium hysterophorus* (Asteraceae) is a traditional medicinal plant used to treat gastrointestinal disorders, such as gastritis. *Helicobacter pylori* have been described as the etiological agent of gastritis, peptic ulcer, as well as gastric adenocarcinoma. 50% of the world's population is infected with this bacterium and the current therapy fails due to the increment in antibiotic resistance; therefore, it is necessary to find new approaches to control *H. pylori* infection, either by its eradication or by preventing the bacterial colonization.

Aim of the study: To investigate the effect of *P. hysterophorus* extracts on *H. pylori* growth and upon its colonization-related factors.

Materials and methods: Five different polarity extracts from roots and aerial parts of *P. hysterophorus* were evaluated *in vitro* against *H. pylori* growth by the broth dilution method. Anti-colonization activities were determined as follows: motility in soft agar plates, urease activity by ammonia colorimetric quantification, and adherence of FITC labeled *H. pylori* to AGS cells by fluorometrical measurement.

Results: Organic extracts inhibited *H. pylori* growth. Particularly, the dichloromethane extract from roots showed a MIC of 15.6 µg/ml while the aqueous extracts showed low or null activity. There is a direct correlation between antibacterial activity and inhibition of motility. Urease activity was partially inhibited by organic extracts, at best 46%, except for the roots dichloromethane extract which reached 74% of inhibition with 500 µg/ml (IC₅₀ = 136.4 µg/ml). Plant extracts inhibited adherence in different ranges but the dichloromethane–methanol ones possessed the highest effect, with a 70% maximal inhibition at 1 mg/ml.

Conclusion: The results indicate that some *P. hysterophorus* extracts have various biological activities that could act synergistically against *H. pylori*. This work contributes to the ethnomedical knowledge of this species and underlines the potential of some organic extracts as a good source for the isolation of bioactive compounds.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The ethnomedical and ethnopharmacological approaches have been helpful in the search of bioactive agents. In various traditional medicine systems worldwide, medicinal plants have been used for centuries, especially against infectious diseases of different natures (Samy and Gopalakrishnakone, 2010).

Parthenium hysterophorus (Asteraceae) is a medicinal plant known as altamisa or chuchiate in Mexico, as Santa Maria or quinine-weed in the United States of America, and as congress grass in India.

In many countries, *P. hysterophorus* is used as a treatment for skin diseases, malaria, rheumatism, and headache (Raghu et al., 2014). The whole plant decoction or tonic is used for digestive illnesses (Martínez, 1969; Argueta, 1994; Oudhia, 2001); particularly, decoctions of roots are used to treat dysentery and stomachache (CSIR, 2001; Oudhia, 2001; Magaña et al., 2010; Raghu et al., 2014). The amount of plant material used and the frequency of its consumption vary depending on the region.

From the phytochemical point of view, *P. hysterophorus* has been widely studied; it has flavonoids such as kaempferol, syringaresinol and quercetin (Rodríguez, 1977; Das et al., 1999; Mears, 1980), phenolic compounds such as chlorogenic acid (Patel, 2011), and phytosterols such as campesterol, β-sitosterol and stigmasterol (Khan and Ahmad, 2008). *P. hysterophorus* is characterized by the presence of terpenes for example ursolic acid, coronopilin,

* Corresponding author. Fax: +52 55 56162419.

E-mail address: irma@bq.unam.mx (I. Romero).

hidroxycoronopilin, hysterin A-D, tetraneurin A, and charminerone (Khan and Ahmad, 2008; Patel, 2011). The most characteristic terpene of the plant is parthenin which is known for its allelopathic properties and for being the major toxic constituent of this plant (Patel, 2011).

Although this plant has been described as allergenic due to the presence of parthenin and other sesquiterpene lactones (Maishi et al., 1998), several beneficial and pharmacological properties have been proposed for the plant and its chemical constituents (for a review see Saini et al. (2014)). These include anti-cancer effects (Venkataiah et al., 2003), hypoglycemic activity (Patel et al., 2008), antioxidant and anti-inflammatory activities (Pandey et al., 2012) and so forth. Moreover, ethanol extracts of the plant showed *in vitro* anti-parasitic effect on *Plasmodium falciparum* (Rodríguez-Pérez et al., 2006) and antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus cohnii*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Serratia* sp., and *Bacillus subtilis* (Feresin et al., 2000). Nevertheless, *P. hysterothorus* activity against *Helicobacter pylori* has never been explored.

H. pylori is a spiral-shaped Gram negative bacteria isolated in 1983 (Warren and Marshall, 1983). It is estimated that 50% of the world population is infected with the bacteria and its presence has been linked to active chronic gastritis, peptic ulcer, gastric cancer, and MALT lymphoma (Lopes et al., 2014). It is classified as a type I carcinogen by the International Agency for Research on Cancer.

The most frequently used eradication regimen is a triple therapy consisting of a proton-pump inhibitor, amoxicillin and clarithromycin. Even this therapy is 80% successful, this value has been declining due to antibiotic resistance (O'Connor et al., 2014), and therefore, it is necessary to find new strategies to control *H. pylori* infection. Recently, inhibition of the bacterial colonization mechanisms has been explored as a new approach to manage the infection. The main bacterial colonization factors are motility, conferred by flagella that allow *H. pylori* to reach its niche (Howitt et al., 2011), the urease enzyme, that helps bacteria to neutralize its microenvironment, and the adherence to gastric epithelial cells, which is a fundamental prerequisite for a successful infection.

The aim of this study was to evaluate *in vitro* if *P. hysterothorus* extracts inhibit *H. pylori* growth and its colonization factors such as urease activity, motility and adhesion to gastric epithelial cells.

2. Material and methods

2.1. Plant material

P. hysterothorus, was collected at Cazonas de Herrera, Veracruz, México (20°41.42'N 97°19.00'W) and identified by M.S. Edelmira Linares. The voucher specimen was deposited in the National Herbarium of Mexico (MEXU 1302111) at the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

2.2. Extract preparation

P. hysterothorus roots were cut from aerial parts and processed separately. The material was air dried, chopped into small pieces and ground to a fine powder. Forty grams of each sample were used to prepare the extracts. For the organic extracts, the material was extracted 3 times for 72 h with 400 ml of hexane (HX), dichloromethane (DM), dichloromethane-methanol 1:1 (DM-MET) or methanol (MET). The extracts were filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. In the case of the aqueous extracts (AQ), the material was boiled for 10 min in 400 ml of water and allowed to stand for 24 h at room temperature before filtering and lyophilizing.

2.3. Bacterial strain and growth media

H. pylori ATCC 43504 was cultured on Casman Agar Base (BBL) supplemented with 5% defibrinated sheep blood, 10 mg/l vancomycin, 5 mg/l trimethoprim, 2 mg/l amphotericin B, and 2.5 mg/l polymyxin B sulfate for 24 h at 37 °C and under microaerobic conditions (10% CO₂, 5% O₂). Stock cultures were stored at –70 °C in Brucella broth (BBL) with 10% fetal bovine serum (FBS) GIBCO BRL and 10% glycerol. The bacteria were routinely identified by Gram stain morphology, catalase, oxidase and urease test reactions, as well as PCR amplification using *ureA* primers.

2.4. Antibacterial activity and minimal inhibition concentration

The antibacterial activity of the extracts was determined by the broth dilution method (Palacios-Espinosa et al., 2014). Briefly, *H. pylori* was grown in Mueller-Hinton broth (BBL) supplemented with 5% defibrinated sheep blood, and the four antibiotics previously mentioned. The extracts were dissolved in DMSO to attain a final concentration in the culture of 7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125.0 and 250.0 µg/ml and then added to 1.5 ml of *H. pylori* culture at the beginning of the exponential growth phase (~1x10⁸ UFC/ml). ΔA₆₀₀ was measured after 24 h of incubation at 37 °C under gentle shaking (150 rpm) and microaerobic conditions, and it was used to calculate the percentage of growth inhibition with respect to a control that grew only in the presence of DMSO (0.66% final concentration, which did not have any effect on bacterial growth). The MIC was defined as the lowest concentration of the extract that inhibited 100% of bacterial growth. At least three independent experiments were performed in triplicate. Amoxicillin and metronidazole were employed as positive controls.

2.5. Motility analysis

An overnight *H. pylori* culture grown in Casman-agar plates was harvested and suspended in Mueller-Hinton broth. After adjusting to A₆₀₀=1.0, 10 µl of bacterial suspension were dropped onto soft agar plates (composed of Brucella Broth and 0.35% agar supplemented with 10 mg/l vancomycin, 5 mg/l trimethoprim, 2 mg/l amphotericin B, and 2.5 mg/l polymyxin B sulfate) with or without *P. hysterothorus* extracts at their MIC and two fold dilutions. Organic extracts were diluted in DMSO (0.033%, final concentration in plates) which did not have any effect on bacterial motility. The plates were incubated at 37 °C under microaerobic conditions for 7 days and the swarming area was measured with the aid of ImageJ[®] software program.

2.6. Preparation of urease and inhibition test

For the urease inhibition assay, *H. pylori* was cultured in broth media as described above and harvested at the middle of the exponential growth phase (A₆₀₀=0.5). Bacteria were washed twice with phosphate buffered saline (PBS) pH=7.2, diluted in PBS with protease inhibitors (Sigma-Aldrich) and sonicated for 90 s in an ice bath (Branson Sonifier 250, with an output of 40). The resulting bacterial lysate was used as the source of urease. Protein concentration was determined with the Bradford's reagent using bovine serum albumin as standard. The preparation was stored at 4 °C until its use in the urease assay.

The urease activity was quantified spectrophotometrically by measuring the release of ammonia using a modification of the Berthelot's reaction (Weatherburn, 1967). The assay mixture, containing PBS, 5 µg protein of bacterial lysate, and extracts (62.5–500 µg/ml) in a final volume of 140 µl, was preincubated for 10 min at 37 °C in 96-well plates. To initiate the reaction, a non-limiting substrate solution of 5 mM urea was added and then

incubated for 10 min. The reaction was stopped by adding 0.119 M phenol and a 0.119 M NaOH/0.059 M NaOCl mixture and the absorbance at 600 nm was measured. The amount of released ammonia was calculated on the basis of a calibration curve prepared with ammonium sulfate (0–10 µg). The urease activity was expressed as nmol of ammonia/min/mg protein. DMSO (used to dissolve the extracts) was included as negative control at a final concentration of 7.1% which did not have effect on the reaction. Acetohydroxamic acid (AHA), a known competitive inhibitor of urease, was employed as positive control (6.3–200 µg/ml)

2.7. AGS cells growth

Human gastric adenocarcinoma cell line (AGS) ATCC 1739 was grown to confluence in Petri dishes (10 mm) in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM) supplemented with 5% (v/v) FBS, 2 mM L-glutamine, 10 µg/ml insulin, 2 mM sodium pyruvate, and 100 U/ml/100 µg/ml penicillin/streptomycin in a 5% CO₂ incubator at 37 °C. For cell passaging, trypsin-EDTA was added, incubated for 5 min, and washed with supplemented D-MEM.

2.8. Inhibition of bacterial adhesion

H. pylori were collected from a liquid culture at the beginning of the exponential growth phase, suspended in PBS (1 × 10⁹ UFC/ml), and incubated with 10 µl of 0.1% fluorescein isothiocyanate (FITC) diluted in DMSO (0.66%) for 1 h at 37 °C in the dark. The excess of FITC was removed by washing two times with PBS.

To assess the bacterial adhesion, 1 × 10⁵ AGS cells/well were plated in 96 well plates with supplemented D-MEM at 37 °C and 5% CO₂ for 24 h. Subsequently, cells were washed, and were infected with 1 × 10⁸ FITC-labeled *H. pylori* in a final volume of 110 µl of D-MEM. After 1 h of incubation under 5% CO₂ and 37 °C in the presence or absence of extracts dissolved in DMSO (0.025–1 mg/ml), AGS cells were washed with PBS in order to eliminate non-adherent bacteria as well as the extracts remnants. The adherence was quantified fluorometrically by measuring the FITC-labeled *H. pylori* bound to AGS cells (FITC excited at 485 nm and detected at 544 nm) using a POLARstar Omega[®] spectrofluorometer. The final DMSO concentration in the media was 9.1% with no effect on the assay. Casein (Sigma-Aldrich) was utilized as positive control (Strömqvist et al., 1995). During the experiment AGS cell viability was monitored by MTT assay.

2.9. Confocal microscopy

AGS cells infected for an hour with FITC-labeled *H. pylori* were washed twice with PBS to eliminate non-bound bacteria. They were fixed in 2% paraformaldehyde for 10 min, washed twice with PBS, and treated with VECTASHIELD[®] Mounting medium. Propidium iodide staining was used for nuclei detection. Fluorescence analysis was conducted in a Leica TCS SP5 confocal microscope system.

2.10. Statistical analysis

Anti-urease, anti-adherent and anti-motility activities are presented as mean ± SEM from at least three independent experiments. One way ANOVA followed by the Dunnett's Multiple Comparison test were performed. A *p* Value < 0.05 was considered to be statistically significant. Prism GraphPad[®] software was used for statistics and plotting.

3. Results and discussion

The ethnomedical reports indicate that *P. hysterothorus*

Table 1
Yield and abbreviations of *P. hysterothorus* extracts.

	Extract	Abbreviation used	Yield % ^a (g obtained)
Roots	Hexane	HXR	0.4 (0.16)
	Dichloromethane	DMr	0.6 (0.24)
	Dichloromethane–Methanol 1:1	DM–METr	4.4 (1.76)
	Methanol	METr	3.8 (1.52)
	Aqueous	AQR	4.3 (1.72)
Aerial parts	Hexane	HXap	1.1 (0.44)
	Dichloromethane	DMap	4.0 (1.60)
	Dichloromethane–Methanol 1:1	DM–METap	8.1 (3.24)
	Methanol	METap	4.9 (1.96)
	Aqueous	AQap	8.9 (3.56)

^a The % yield was calculated with respect to plant starting material (40 g).

decoctions are the most common way of consumption, mainly of its roots. Considering this, the decoctions of roots and aerial parts were tested separately. Moreover, to evaluate the potential of the plant, 4 different polarity organic extracts were assayed. The yield obtained and the abbreviations used for each extract are presented in Table 1.

Taking into account that *P. hysterothorus* has never been tested before on *H. pylori*, we first decided to determine its effect on the bacterial growth.

3.1. Antibacterial activity

Organic and aqueous extracts from *P. hysterothorus*, were tested for their anti-*H. pylori* activity *in vitro* after a 24 h incubation period. Table 2 shows the MIC values obtained for each extract. The DM extract of roots showed the highest inhibitory effect with a MIC = 15.6 µg/ml, followed by the HX extract of roots and the DM extract of aerial parts (MIC = 31.3 µg/ml). In contrast, the polar extracts (MET and AQ) had the lowest activities. The table also includes the MIC values of the positive controls (amoxicillin and metronidazole) which are within the range reported by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Compared to amoxicillin the extracts inhibited bacterial growth at much higher concentrations, but compared to metronidazole, their antibacterial activity was better (except for the AQ ones). This last antibiotic is widely used despite having high resistance rates reported (Malfertheiner et al., 2012).

It is worth noting that some of the species extracts could be a good source for the isolation of compounds with anti-*H. pylori* activity.

Once determined that some of the extracts inhibited bacterial growth, we studied their effect upon colonization factors.

3.2. Urease inhibition

The inhibition of urease results in a disturbance of one of the most crucial steps in *H. pylori* colonization. The main role of urease is neutralization of the bacterial microenvironment by the hydrolysis of urea into ammonia and carbon dioxide, which raises the pH; this increment changes the viscoelasticity properties of gastric mucins, thus facilitating bacterial motility (Celli et al., 2009). It has been proposed that during the process, urease generates a H⁺ gradient that could be used by the flagella (Yoshiyama and Nakazawa, 2000).

We studied the ability of *P. hysterothorus* extracts to inhibit urease enzyme. The activity was measured colorimetrically by quantifying the released ammonia during the reaction. As it can be

Table 2
Summary of the results obtained for *P. hysterophorus* extracts on *H. pylori*.

Extract	Roots				Aerial parts			
	MIC (µg/ml)	Antiurease activity (µg/ml = %)	Motility inhibition (µg/ml = %)	Antiadherence (µg/ml = %)	MIC (µg/ml)	Antiurease activity (µg/ml = %)	Motility inhibition (µg/ml = %)	Antiadherence (µg/ml = %)
HEX	31.3	62.5=27	3.9=18	50.0=25	62.5	62.5=26	3.9=21	50.0=30
		125.0=38	7.8=35	100.0=23		125.0=29	7.8=41	100.0=29
		250.0=25	15.6=68	250.0=35		250.0=46	15.6=51	250.0=27
		500.0=24		500.0=42		500.0=40	31.3=67	500.0=30
DM	15.6	62.5=36	3.9=1	50.0=19	31.3	62.5=14	3.9=9	50.0=6
		125.0=53	7.8=15	100.0=13		125.0=36	7.8=36	100.0=4
		250.0=54	15.6=59	250.0=12		250.0=28	15.6=58	250.0=16
		500.0=74		500.0=20		500.0=26	31.3=65	500.0=19
DM-MET	62.5	62.5=24	3.9=2	50.0=37	62.5	62.5=43	3.9=17	50.0=30
		125.0=29	7.8=7	100.0=32		125.0=44	7.8=31	100.0=43
		250.0=34	15.6=26	250.0=47		250.0=33	15.6=31	250.0=53
		500.0=36	31.3=31	500.0=51		500.0=26	31.3=49	500.0=64
		62.5=80			62.5=68			
MET	125.0	62.5=18	7.8=9	50.0=19	125.0	62.5=18	7.8=13	50.0=25
		125.0=27	15.6=1	100.0=25		125.0=40	15.6=32	100.0=25
		250.0=29	31.3=0	250.0=36		250.0=27	31.3=41	250.0=27
		500.0=30	62.5=37	500.0=44		500.0=21	62.5=59	500.0=30
		125.0=71			125.0=75			
AQ	> 250.0 (250.0=22%)	62.5=19	31.3=11	100.0=3	> 250.0 (250.0=27%)	62.5=7	31.3=22	50.0=20
		125.0=14	62.5=3	250.0=14		125.0=13	62.5=26	100.0=16
		250.0=11	125.0=4	500.0=13		250.0=29	125.0=25	250.0=26
		500.0=7	250.0=9			500.0=24	250.0=33	500.0=30
Positive controls								
Amoxicillin	0.0075			0.0075				
Metronidazole	200			200				
AHA		IC ₅₀ =11.7 µg/ml				IC ₅₀ =11.7 µg/ml		
Casein			500.0=42				500.0=42	

The MIC's in bold stands out more active values compared to metronidazole (MIC=200.0 µg/ml). Bold-italic values are those overpassing 50% of activity.

seen in Table 2, DMr extract showed the strongest inhibitory activity depending on the concentration used, reaching a maximal inhibition of 74% with 500 µg/ml. The IC₅₀ value for DMr was 136.4 µg/ml. The rest of the extracts had incomplete maximal inhibition values (at best, the HXap maximal inhibition reached 46%). In general, a decrease in the inhibitory effect was observed at high concentrations (250 and/or 500 µg/ml) (Table 2 and Supplementary Fig. S1). AHA, used as positive control, completely inhibited the urease activity and presented an IC₅₀=11.7 µg/ml.

Numerous plant extracts and isolated natural products have shown great potential to inhibit urease activity; most of them have been tested in *Canavalia ensiformis* urease but also in *H. pylori* enzyme. Extracts with a remarkable activity *in vitro* have IC₅₀ values in the range of 6.5–92 µg/ml; and in the case of the pure active compounds the range is between 4.8 and 200 µM (see Modolo et al. (2015) for a review of the topic). Our results are not as good as these natural products, but the activity showed by the DMr extract is not negligible. It is important to notice that many available urease inhibitors, such as phosphorodiamidates, hydroxamic acid derivatives and imidazoles are toxic and of low stability, features that prevent their clinical use (Ibrar et al., 2013). Furthermore, in a clinical trial, in which 750 mg of AHA was administered orally in a single dose to *H. pylori* infected patients, a temporary inhibitory effect on urease and ammonia production was observed, but it was not enough to clear the infection (El Nujumi et al., 1991). Then, the search for novel urease inhibitors, more stable and safer still stands. Considering this, it is not

possible yet to discard the potential of *P. hysterophorus* extracts as a source for the isolation of urease inhibitors and therefore as a treatment against *H. pylori*, however it is necessary to test first their toxicity and stability.

3.3. Motility inhibition

In order to examine *P. hysterophorus* extracts ability to inhibit *H. pylori* swarming motility, the swarm surface area produced in 7 days in soft agar plates (0.35%) in the presence or absence of the extracts was quantified. Since the majority of the extracts inhibited bacterial growth, we tested their effect at the MIC and two fold serial dilutions. Due to the low yield obtained in the case of the HX extracts, we started with half of the MIC. In the absence of the extracts, bacteria showed a swarming halo around the seeded spot (Fig. 1a); in contrast, in the presence of inhibitory extracts a significant reduction in the halo was observed (Fig. 1b).

As shown in Table 2, most of the extracts significantly inhibited bacterial motility in a concentration-dependent fashion with a maximum effect between 60% and 80% (See Supplementary Fig. S2 for statistical analysis). The AQ extracts behaved different. On the one hand, the AQr extract had no activity while the AQap extract significantly inhibited between 20% and 30%, independently of the concentration.

Analyzing these results, motility inhibition correlates with the anti-*H. pylori* activity of the extract. At the MIC it could be expected a total inhibition of motility, nevertheless, at this

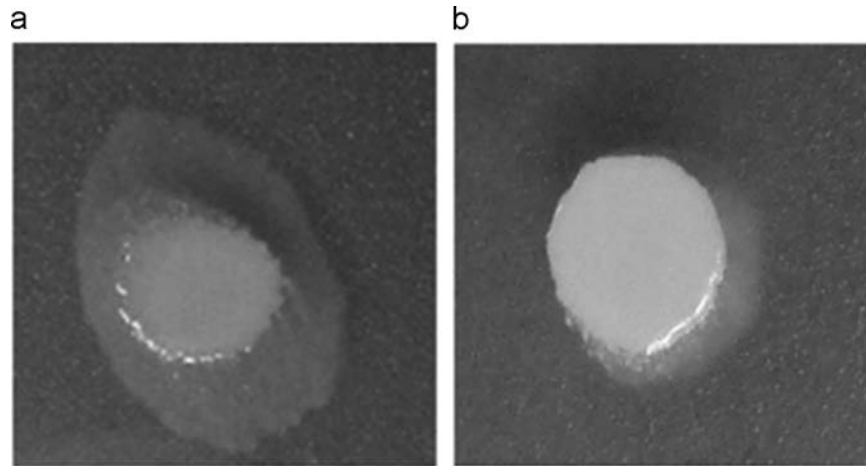


Fig. 1. Representative images of *H. pylori* motility halos in soft agar plates. (a) Control (in the absence of extracts) (b) In the presence of an inhibitory extract.

concentration, there was still a 20–40% of swarm depending on the extract used (Table 2). This could be explained by (1) differences in the availability of the extract in each assay (the MIC test was conducted in a broth culture whereas motility was assessed in soft agar), (2) decomposition of the extract during the experiment (1 day for MIC vs 7 days for motility), or (3) acquired bacterial resistance. These possibilities should be explored before reaching any conclusion; however the experimental observation is an inhibition of *H. pylori* motility.

Only few natural products have been evaluated as anti-motility agents. One of them is syringaresinol, a lignan isolated from unripe Japanese apricot that inhibited 50% of motility at 50 $\mu\text{g/ml}$ and approximately 90% at 500 $\mu\text{g/ml}$ (Miyazawa et al., 2006). The presence of this compound has been reported in *P. hysterophorus* (Das et al., 1999), so it could possibly be responsible for the anti-motility activity of the plant; nevertheless, it is still necessary its quantification in the extracts.

Flagella movement is driven by the energy supplied by a H^+ gradient. Urea hydrolysis could contribute to produce it, as previously mentioned (Yoshiyama and Nakazawa, 2000). In this context, the inhibition of urease activity obtained in the presence of *P. hysterophorus* extracts (Table 2 and Supplementary Fig. S1) could explain the significant reduction in bacterial motility. Indeed, it has been demonstrated that the flavonoid sofalcone, found in some plants and used as a mucosal protective agent in the treatment of gastritis and ulcers, inhibits motility of *H. pylori* through urease inhibition (Yoshiyama et al., 2000).

Therefore, as motility is fundamental to overpass the gastric mucus layers favoring the contact with gastric cells, its inhibition would guarantee a decrease of bacterial colonization.

3.4. Inhibition of Binding to AGS cells

Bacterial adherence is a prerequisite for colonization and infection, thus it is important to search for new drugs that could inhibit this process. In order to investigate the effect of *P. hysterophorus* extracts upon the adhesion of *H. pylori* to AGS cells, an *in vitro* binding fluorometric assay was performed.

The effect on the adhesion of bacteria to AGS cells in the presence of increasing extracts' concentration is depicted in Fig. 2. Two groups can be distinguished depending on the degree of maximal adherence inhibition. In the case of roots extracts (Fig. 2a), the low activity group (< 50% inhibition) is comprised of AQ and DM extracts, and the high activity group ($\geq 50\%$ inhibition) includes MET, DM–MET and HX extracts. For the aerial parts extracts (Fig. 2b), the low activity group is composed by all the

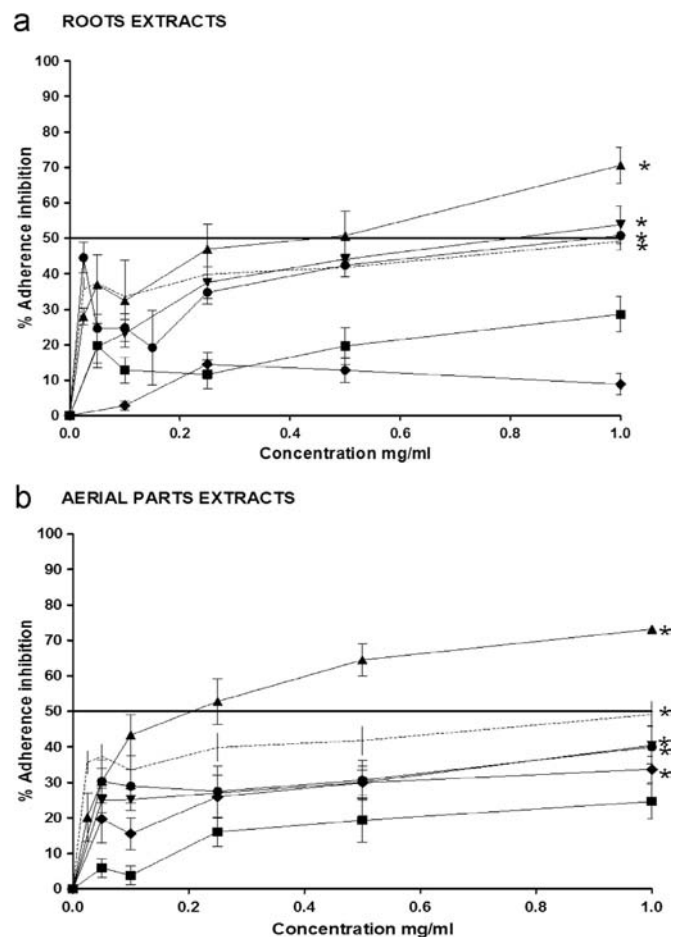


Fig. 2. Effect of *P. hysterophorus* extracts on adhesion of *H. pylori* to AGS cells. Adhesion was quantified by fluorescence of FITC labeled-attached bacteria. (a) Roots extracts (b) Aerial parts extracts: dashed line Casein, ●HX, ■DM, ▲DM–MET, ▼MET, and ◆AQ extracts. The control (without extracts) was used to establish 100% adherence equivalent to 40,000 relative fluorescence units. %Inhibition = $[(H. pylori \text{ bound without treatment} - H. pylori \text{ bound with treatment}) / (H. pylori \text{ bound without treatment})] \times 100$. Assays were performed 4 times in quadruplicate and are presented as mean \pm SEM. (*) indicate extracts with significant difference compared to the negative control, $p < 0.05$ by Dunnett's Multiple Comparison test.

extracts, except DM–MET, which belongs to the high activity group. Both DM–MET extracts had an outstanding activity, significantly different compared to the control without extract. They inhibited in a concentration-dependent fashion, with a 70%

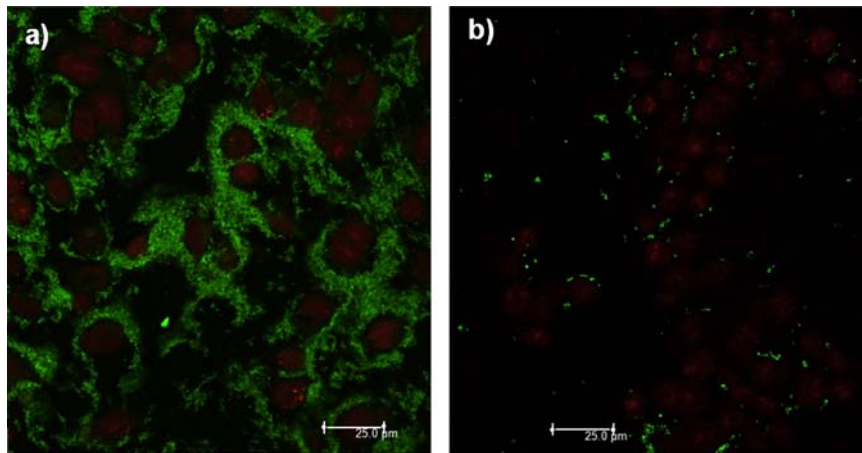


Fig. 3. Representative confocal microscopy images of AGS cells (nuclei are stained with propidium iodide) infected with FITC-labeled *H. pylori* in the absence (left) or in the presence (right) of 1 mg/ml of DM–METap extract.

maximal inhibition at 1 mg/ml. Particularly, the DM–METap extract was more potent than its roots counterpart since it inhibited by 45% with 0.1 mg/ml. Casein used as positive control, from 0.025 to 1 mg/ml inhibited a maximum of about 40% (Strömqvist et al., 1995).

Confocal microscopy was used to illustrate the effect of DM–METap extract in the attachment of *H. pylori* to AGS cells (Fig. 3). In the negative control, it could be seen numerous bacteria attached to intercellular junctions' area of AGS cells (Fig. 3a), as it has been previously reported (Costa et al., 2013), in contrast to the sample treated with DM–METap extract, where only few bacteria adhered to the cells (Fig. 3b).

The search of plant anti-adhesive agents has been undertaken before by various researchers. Successful inhibition of *H. pylori* adhesion to stomach sections has been obtained with aqueous extracts of *Curcuma longa*, *Borago officinalis* and *Petroselinum crispum* which blocked bacterial adhesion by 62%, 61%, and 40%, respectively, with 50 mg/ml (O'Mahony et al., 2005). Moreover, it has been reported that extracts obtained from *Phyllanthus urinaria*, *Camellia sinensis*, and *Pelargonium sidoides* (EPs[®] 7630) inhibited the adhesion to AGS cells by 100% (with 0.5 mg/ml), 60% (with 2.0 mg/ml), and 50% (with 0.1 mg/ml), respectively (Lai et al., 2008; Lee et al., 2009; Beil and Kilian, 2007). Meanwhile, an apple peel extract showed to inhibit the attachment of *H. pylori* to HeLa cells by 80% at 10 mg/ml (Pastene et al., 2010).

Considering that it is well known that surface carbohydrates mediate cell–cell recognition through multiple interactions, plant polysaccharide fractions have also been tested for their anti-adhesive properties. Lee et al., (2004) demonstrated the inhibition of *H. pylori* adhesion to AGS cells with 2.8 mg/ml of polysaccharide fractions of *Panax ginseng* (66%) and *Artemisia capillaris* (44%). Other polysaccharide rich fractions such as the ones obtained from *Glycyrrhiza glabra* and *Aloe vera* (Wittschier et al., 2009; Xu et al., 2010) inhibited the adherence approximately by 40% with 1 mg/ml.

Adherence to the gastric epithelium is important for *H. pylori* to produce disease. In this sense, several studies show that the binding of the bacteria is mediated by multiple adhesins (the most studied are BabA and SabA) and different receptors whose availability changes according to inflammation and glycan expression at the epithelial surface (Sheu et al., 2010). Up to now, it is not completely characterized the complex adherence–receptor network related to *H. pylori* infection.

Collectively, the above information helps to understand why it has been so difficult to reach a complete inhibition of the attachment of *H. pylori* to cells. From this point of view, *P. hysterothorus*

DM–MET extracts have potential to be used for obtaining active anti-adhesive metabolites and to be part of a prophylactic or eradication therapies.

4. Final remarks

H. pylori is a successful human pathogen, which colonizes the mucus layer of the gastric epithelium inducing a chronic gastritis that could evolve to more severe diseases such as peptic ulcer disease, gastric adenocarcinoma, and MALT lymphoma. Current eradication antibiotic-based therapies entail several inherent problems including the appearance of resistance. There is therefore a constant need for new antimicrobial agents and novel approaches for the treatment. Moreover, as there is not still a vaccine against the bacterium, it would be ideal the development of preventive treatments, as those that could inhibit the bacterial colonization factors.

This study represents the first effort done to investigate the effect of *P. hysterothorus*, a folk medicinal plant employed as a treatment for gastric diseases, on *H. pylori* growth, and its colonization factors *in vitro*.

Our results showed that AQs extracts were not active against *H. pylori*. This is interesting since the majority of the traditional ethnomedical reports indicate that decoctions of the aerial parts, leaves, and especially of roots are the main form of use to treat gastric diseases. Only by taking into account our results, we cannot justify the traditional use of *P. hysterothorus* in the decoction form. However, the viability of this traditional use cannot be ruled out as it could have other beneficial properties different to those studied in this work. For instance, Bucciarelli and Skliar (2007) reported a gastroprotective effect (91%) of an AQ extract of *P. hysterothorus* capitula in an ethanol-induced ulcer animal model, so maybe this activity could support its traditional use.

We observed that all of the organic extracts presented certain degree of inhibition with respect to the activities tested. Nevertheless, the roots organic extracts are better than the aerial parts extracts in terms of antibacterial and antiurease activities (Table 2). It is interesting that none of them have at the same time all the maximal activities, for example, the DMr extract had an excellent MIC value, the best antiurease activity and inhibited well the motility, but it did not exhibited good anti-adhesive properties (Table 2).

Our results demonstrate that *P. hysterothorus* plant has many biological activities that could act synergistically. The extracts, in addition to its antibiotic activity, are able to partially inhibit the

urease enzyme, the adherence to gastric epithelial cells and the motility, which are fundamental steps in bacterial colonization. In view of its polyvalent effects, *P. hysterophorus* or some of its extracts have the potential to be used as prophylactic and/or therapeutic alternatives in the treatment of gastritis-like disorders produced by *H. pylori*, however further studies are necessary to suggest its usefulness as a therapy.

Although *P. hysterophorus* is known to be allergenic in India (Patel, 2011), there are few references about its toxicity. Fernández-Calienes et al. (2009), using the primary lethality bioassay with the brine shrimp *Artemia salina*, did not find toxicity with an ethanol extract of roots ($LC_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$), meanwhile the ethanolic extract of aerial parts resulted to be moderately toxic ($LC_{50} = 309.7 \mu\text{g/ml}$). In another report employing a mice model, an ethanol extract of the aerial parts of the plant administered via intraperitoneal route for 6 days, resulted toxic at 500 mg/kg (100% of mortality), but harmless at 250 mg/kg (Rodríguez-Pérez et al., 2006). On the contrary, Pandey et al. (2012) did not find any sign of toxicity when administered orally a unique dose of 2000 mg/kg of an ethanolic extract of leaves to mice in 72 h. But when a dose 5000 mg/kg was administered, mortality was observed. So, according to Lorke's criteria for acute toxicity, the extract is considered slightly toxic.

Regarding the cytotoxic effects of *P. hysterophorus* extracts on human cells, Kumar et al. (2013), reported the cytotoxicity of sequentially leaves extracts against three cancer cell lines: DU-145 (prostate), MCF-7 (breast) and THP-1 (leukemia) at 100 $\mu\text{g/ml}$ using Sulforhodamine B assay. Among all the extracts tested, the ethanol extract was the most potent, since it significantly inhibited the proliferation of the three different cell lines (85, 81, and 50% for THP-1, MCF-7, and DU-145, respectively). The chloroform and ethyl acetate extracts produced moderate (< 50%) cytotoxic activity against MCF-7 and THP-1 cell lines. The benzene extract exhibited 53% of cytotoxic activity only against MCF-7 cell line. The aqueous extract did not show a cytotoxic effect. Since the ethanol extract was the most cytotoxic, it was further assayed against HL-60 (promyelocytic leukemia) cell line using the MTT assay obtaining an $IC_{50} = 50 \mu\text{g/ml}$. Meanwhile, Fernández-Calienes et al. (2010), determined an $IC_{50} = 282.8 \mu\text{g/ml}$ of an ethanol roots extract using the human diploid embryonic lung cell line MRC-5 with the MTT assay. According to the USA National Cancer Institute, a plant extract is generally considered to have active cytotoxic effect with an IC_{50} value $\leq 20 \mu\text{g/ml}$ (Cordell et al., 1993). Therefore, all the plant extracts tested in the previous reports can be considered as moderately or non-cytotoxic.

Concerning parthenin, the most characteristic sesquiterpene lactone from the species, a $LD_{50} = 42 \text{ mg/kg}$ (i.p.) has been reported (Narasimham et al., 1984), and the induction of chromosomal aberrations in blood lymphocytes exposed to 10–60 μM for 20 h, has been documented (Ramos et al., 2002).

Finally, the possibility of discovering useful novel inhibitors from specific extracts of the species (mainly antibiotic and anti-adhesive compounds) is open. Further experiments to establish the anti-adhesive bioactive compounds are in progress.

Acknowledgments

This study was partially supported by DGAPA-UNAM (IN225711 and IN216414). The authors thank Daniela Durán Sánchez for her technical support and C.D. María José Gómora Herrera from the Laboratorio de Desarrollo Gonadal, Fac. de Medicina, UNAM, for her assistance with confocal microscopy. J. Espinosa-Rivero was supported by the Ph.D. Program Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de

Mexico (UNAM), and by a scholarship from CONACYT (366598). We thank Drs. Erika Gómez-Chang and Rebeca Romero-Álvarez for reviewing the proper usage of English.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.08.021>.

References

- Argueta, A., 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 1^o edición. Instituto Nacional Indigenista, México.
- Beil, W., Kilian, P., 2007. EPs[®], an extract from *Pelargonium sidoides* roots inhibits adherence of *Helicobacter pylori* to gastric epithelial cells. *Phytomedicine* 14, 5–8.
- Bucciarelli, A., Skliar, M.I., 2007. Plantas medicinales de Argentina con actividad gastroprotectora. *Ars Pharm.* 48, 361–369.
- Celli, J.P., Turner, B.S., Afdhal, N.H., Keates, S., Ghiran, I., Kelly, C.P., Ewaldt, R.H., McKinley, G.H., So, P., Erramilli, S., Bansil, R., 2009. *Helicobacter pylori* moves through mucus by reducing mucin viscoelasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 14321–14326.
- Cordell, G.A., Kinghorn, A.D., Pezzuto, J.M., 1993. Separation, structure elucidation and bioassay of cytotoxic natural products. In: Colegate, S.M., Molyneux, R.J. (Eds.), *Bioactive Natural Products: Detection, Isolation and Structure Determination*. CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 195–220.
- Costa, A.M., Leite, M., Seuca, R., Figueiredo, C., 2013. Adherens junctions as targets of microorganisms: a focus on *Helicobacter pylori*. *FEBS Lett.* 587, 259–265.
- CSIR, 2001. The Wealth of India. First Supplementary Series (Raw Materials) Vol. 7. Ci.Cy. National Institute of Science Communication, CSIR, India.
- Das, B., Venkataiah, B., Kashinatham, A., 1999. (+)-Syringaresinol from *Parthenium hysterophorus*. *Fitoterapia* 70, 101–102.
- El Nujumi, A.M., Dorrian, C.A., Chittajallu, R.S., Neithercut, W.D., McCol, K.E.L., 1991. Effect of inhibition of *Helicobacter pylori* urease activity by acetohydroxamic acid on serum gastrin in duodenal ulcer subjects. *Gut* 32, 866–870.
- Feresin, G.E., Tapia, A.A., Bustos, D.A., 2000. Antibacterial activity of some medicinal plants from San Juan, Argentina. *Fitoterapia* 71, 429–432.
- Fernández-Calienes, V.A., Mendiola, M.J., Monzote, F.L., García, P.M., Sariego, R.L., Acuña, R.D., Scull, L.R., Gutiérrez, G.Y., 2009. Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. *Rev. Cuba. Med. Trop.* 61, 254–258.
- Fernández-Calienes, V.A., Mendiola, M.J., Scull, L.R., Gutiérrez, G.Y., Acuña, R.D., Abreu, P.J., 2010. *In vitro* Antimalarial activity and cytotoxicity of some selected Cuban medicinal plants. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 52, 197–201.
- Howitt, M.R., Lee, J.Y., Lertsethaktarn, P., Vogelmann, R., Joubert, L.M., Ottemann, K. M., Amieva, M.R., 2011. ChePep Controls *Helicobacter pylori* Infection of the Gastric Glands and Chemotaxis in the *Epsilonproteobacteria*. *mBio* 2, 1–10.
- Ibrar, A., Khan, I., Abbas, N., 2013. Structurally diversified heterocycles and related privileged scaffolds as potential urease inhibitors: a brief overview. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 346, 423–446.
- Khan, M.S., Ahmad, S., 2008. Pharmacognostical, phytochemical, biological and tissue culture studies on *Parthenium hysterophorus* Linn.: a review. *Internet J. Alternative Med* 6 (2), 1–5.
- Kumar, S., Chashoo, G., Saxena, A.K., Pandey, A.K., 2013. *Parthenium hysterophorus*: a probable source of anticancer, antioxidant and anti-HIV agents. *Biomed. Res. Int.* 2013, 1–11.
- Lai, C.H., Fang, S.H., Rao, Y.K., Geethangili, M., Tang, S.H., Lin, Y.J., Hung, C.H., Wang, W.C., Tzeng, Y.M., 2008. Inhibition of *Helicobacter pylori*-induced inflammation in human gastric epithelial AGS cells by *Phyllanthus urinaria* extracts. *J. Ethnopharmacol.* 118, 522–526.
- Lee, J.H., Park, E.K., Uhm, C.S., Chung, M.S., Kim, K.H., 2004. Inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric Adenocarcinoma epithelial cells by acidic polysaccharides from *Artemisia capillaris* and *Panax ginseng*. *Planta Med.* 70, 615–619.
- Lee, J.H., Shim, J.S., Chung, M.S., Lim, S.T., Kim, K.H., 2009. *In vitro* anti-adhesive activity of green tea extract against pathogen adhesion. *Phytothe. Res.* 23, 460–466.
- Lopes, D., Nunes, C., Martins, M.C.L., Sarmiento, B., Reis, S., 2014. Eradication of *Helicobacter pylori*: past, present and future. *J. Controll. Release* 189, 169–186.
- Magaña, A.M.A., Gama, C.L.M., Mariaca, M.R., 2010. El uso de las plantas medicinales en las comunidades Maya-Chontales de Nacajuca, Tabasco, México. *Polibotánica* 29, 213–262.
- Maishi, A.I., Ali, S.P.K., Chaghtai, S.A., Khan, G., 1998. A proving of *Parthenium hysterophorus*, L. Br. Homoeopath. J. 87, 17–21.
- Malferteiner, P., Megraud, F., O'Morain, C.A., Atherton, J., Axon, A.T.R., Bazzoli, F., Gensini, J.F., Gisbert, J.P., Graham, D.Y., Rokkas, T., El-Omar, E.M., Kuipers, E.J., 2012. Management of *Helicobacter pylori* infection – the Maastricht IV/Florence consensus report. *Gut* 61, 646–664.
- Martínez, M., 1969. Las Plantas Medicinales de México, 5^o edición. Botas, México.
- Mears, J.A., 1980. The flavonoids of *Parthenium* L. *J. Nat. Prod.* 43, 708–716.

- Miyazawa, M., Utsunomiya, H., Inada, K., Yamada, T., Okuno, Y., Tanaka, H., Tate-matsu, M., 2006. Inhibition of *Helicobacter pylori* motility by (+)-Syringaresinol from unripe Japanese apricot. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 172–173.
- Modolo, L.V., de Souza, A.X., Horta, L.P., Araujo, D.P., Fátima, A., 2015. An overview on the potential of natural products as ureases inhibitors: a review. *J. Adv. Res.* 6, 34–44.
- Narasimham, T.R., Keshava, M.B.S., Harindranath, N., Subba, R.P.V., 1984. Characterization of a toxin from *Parthenium hysterophorus* and its mode of excretion in animals. *J. Biosci.* 5, 729–738.
- O'Connor, A., Vaira, D., Gisbert, J.P., O'Morain, C., 2014. Treatment of *Helicobacter pylori* Infection 2014. *Helicobacter* 19, 38–45.
- O'Mahony, R., Al-Khtheeri, H., Weerasekera, D., Fernando, N., Vaira, D., Holton, J., Basset, C., 2005. Bactericidal and anti-adhesive properties of culinary and medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *World J. Gastroenterol.* 11, 7499–7507.
- Oudhia, P., 2001. Medicinal Uses of Congress Weed *Parthenium hysterophorus* L.: A Review. Society for Parthenium hysterophorus L Management (SOPAM), Raipur, India.
- Palacios-Espinosa, J.F., Arroyo-García, O., arcía-Valencia, G., Linares, G., Bye, E., Romero, I., R., 2014. Evidence of the anti-*Helicobacter pylori*, gastroprotective and anti-inflammatory activities of *Cuphea aequipetala* infusion. *J. Ethnopharmacol.* 151, 990–998.
- Pandey, K., Sharma, P.K., R. Dudhe, R., 2012. Antioxidant and anti-inflammatory activity of ethanolic extract of *Parthenium hysterophorus* Linn. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 5, 28–31.
- Pastene, E., Speisky, H., García, A., Moreno, J., Troncoso, M., Figueroa, G., 2010. *In vitro* and *in vivo* effects of apple peel polyphenols against *Helicobacter pylori*. *J. Agric. Food Chem.* 58, 7172–7179.
- Patel, V.S., Chitra, V., Prasanna, L.P., Krishnaraju, V., 2008. Hypoglycemic effect of aqueous extract of *Parthenium hysterophorus* L. in normal and alloxan induced diabetic rats. *Indian J. Pharm.* 40, 183–185.
- Patel, S., 2011. Harmful and beneficial aspects of *Parthenium hysterophorus*: an update. *Biotech* 1, 1–9.
- Raghu, J.D., Veerashakar, T., Kuppast, I.J., Dharshan, S., Ravi, M.C., 2014. A review on *Parthenium hysterophorus* Linn. *Int. J. Univ. Pharm. BioSci.* 3, 110–120.
- Ramos, A., Rivero, R., Visozo, A., Piloto, J., García, A., 2002. Parthenin, a sesquiterpene lactone of *Parthenium hysterophorus* L. is a high toxicity clastogen. *Mut. Res./Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 514, 19–27.
- Rodríguez, E., 1977. Ecogeographic distribution of secondary constituents in *Parthenium* (compositae). *Biochem. Syst. Ecol.* 5, 207–218.
- Rodríguez-Pérez, M., Martínez, M., Rivero, L.R., Álvarez, H.M.H., Valdez, A.F.C., Rodríguez, D.A., Lizama, R.S., Payrol, J.A., 2006. Evaluación de la actividad antimicrobial de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional cubana. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 27, 197–205.
- Saini, A., Aggarwal, N.K., Sharma, A., Kaur, M., Yadav, A., 2014. Utility potential of *Parthenium hysterophorus* for its strategic management. *Adv. Agric.* 2014, 1–16, Article ID 381859.
- Samy, R.P., Gopalakrishnakone, P., 2010. Therapeutic potential of plants as antimicrobials for drug discovery. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* 7, 283–294.
- Sheu, B.S., Yang, H.B., Yeh, Y.C., Wu, J.J., 2010. *Helicobacter pylori* colonization of the human gastric epithelium: a bug's first step is a novel target for us. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 25, 26–32.
- Strömqvist, M., Falk, P., Bergström, S., Hansson, L., Lönnerdal, B., Normark, S., Her-nell, O., 1995. Human milk κ -Casein and inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucosa. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 21, 288–296.
- Venkataiah, B., Ramesh, C., Ravindranath, N., Das, B., 2003. Charminerone, a seco-pseudoguaianolide from *Parthenium hysterophorus*. *Phytochemistry* 63, 383–386.
- Warren, R., Marshall, B., 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet.* 321, 1273–1275.
- Weatherburn, M.W., 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* 39, 971–973.
- Wittschier, N., Faller, G., Hensel, A., 2009. Aqueous extracts and polysaccharides from Liquorice roots (*Glycyrrhiza glabra* L.) inhibit adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa. *J. Ethnopharmacol.* 125, 218–223.
- Xu, C., Ruan, X.M., Li, H.S., Guo, B.X., Ren, X.D., Shuang, J.L., Zhang, Z., 2010. Anti-adhesive effect of an acidic polysaccharide from *Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.) Berger on the binding of *Helicobacter pylori* to the MKN-45 cell line. *J. Pharm. Pharmacol.* 62, 1753–1759.
- Yoshiyama, H., Nakazawa, T., 2000. Unique mechanism of *Helicobacter pylori* for colonizing the gastric mucus. *Microbes Infect.* 2, 55–60.
- Yoshiyama, H., Nakamura, H., Okamoto, T., Okita, K., Nakazawa, T., 2000. A novel *in vitro* effect of the mucosal protective agent sofalcone-inhibition of chemotactic motility in *Helicobacter pylori*. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 14, 230–236.



Butanda Ochoa A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Lara Lemus R, Torres Durán PV. **Mensaje Bioquímico**, Vol. XLI, 85-102, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F, MÉXICO. (2014). (<http://bq.unam.mx/comitetab/TAB2014>)

(ISSN-0188-137X)

A 30 AÑOS DEL DESCUBRIMIENTO DE *Helicobacter pylori*. USO DE PLANTAS MEDICINALES COMO FUENTE DE TERAPIAS

30 YEARS SINCE THE DISCOVERY OF *Helicobacter pylori*. USE OF MEDICINAL PLANTS AS A SOURCE OF THERAPIES

Jazmín Espinosa Rivero e Irma Romero Álvarez

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional
Autónoma de México

Ciudad Universitaria, CP 04510, México, D.F. México

irma@bq.unam.mx

Resumen

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa, que coloniza la mucosa gástrica del humano. Se ha asociado su infección con gastritis crónica, úlcera péptica y adenocarcinoma gástrico. El 50% de la población mundial está infectada y en México se ha reportado una seroprevalencia del 66%. *H. pylori* ha desarrollado mecanismos de colonización y virulencia que aseguran el éxito en el establecimiento de su nicho. Esto desencadena una respuesta local y sistémica

por parte del sistema inmune, no obstante, la bacteria puede modular esta reacción e infectar a su hospedero de manera crónica. Las terapias para erradicar a la bacteria son efectivas en el 80% de los casos, sin embargo, son caras y generan efectos secundarios, por lo que el paciente abandona el tratamiento, favoreciendo la reincidencia de la infección y la resistencia bacteriana. De tal manera que resulta imprescindible la búsqueda de nuevos tratamientos y/o compuestos para prevenir y controlar las enfermedades relacionadas con *H. pylori*. Nuestro grupo de trabajo ha buscado estas alternativas con base en el conocimiento tradicional de las plantas medicinales mexicanas y se han abordado diferentes estrategias como son la identificación de compuestos activos contra la bacteria a partir de plantas medicinales, el estudio de extractos con efectos polifarmacológicos que no solo eliminan a la bacteria, sino que también incidan sobre la sintomatología asociada y, finalmente, la identificación de extractos y compuestos de las plantas capaces de inhibir los procesos de colonización de la bacteria.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, plantas medicinales, antibiótico, gastroprotección, colonización.

Abstract

Helicobacter pylori is a Gram-negative bacterium that colonizes the human gastric mucosa. Its infection has been associated with chronic gastritis, peptic ulcer, and gastric adenocarcinoma. Half of the world's population is infected; in Mexico, a 66% seroprevalence has been reported. *H. pylori* has developed colonization and virulence mechanisms that ensure its establishment in its niche. This triggers a host local and systemic immune response; however, the bacterium can modulate this reaction making a chronic infection. Therapies to eradicate the bacteria are effective in 80% of cases; however, they are expensive and produce many side effects, making the patient leaves the treatment, promoting the infection recurrence and bacterial resistance. Consequently, the development of new therapeutic modalities or compounds to prevent and treat *H. pylori* related diseases is essential. Our group has sought these alternatives based on traditional knowledge of Mexican medicinal plants and have addressed different strategies such as the identification of active compounds against the bacteria from medicinal plants, the study of extracts with polypharmacologic effects that not only kills the bacteria but also impact on the associated symptoms, and the identification of

extracts and plant compounds capable of inhibiting the bacterial colonization process, thereby helping in the prophylaxis of the diseases.

Keywords: *Helicobacter pylori*, medicinal plants, antibiotic, gastroprotection, colonization.

Antecedentes históricos

Durante el siglo pasado se creía que la gastritis y las úlceras pépticas eran producto de la hipersecreción de ácido gástrico, fruto de una vida estresada, pero a principios de los años 80, un hallazgo de dos médicos australianos cambió radicalmente la historia natural de las enfermedades pépticas. El patólogo Robin Warren observó a una bacteria en el tejido inflamado de la mucosa gástrica de pacientes con gastritis crónica y meses después Barry Marshall, gastroenterólogo, logró cultivarla. En 1983, publicaron en *The Lancet* [1], la presencia en la mucosa gástrica de un bacilo curvado, microaerófilo, Gram negativo y lo asociaron a la gastritis y úlcera, al cual llamaron posteriormente *Campylobacter pyloridis*. En 1989, la bacteria se reclasificó como *Helicobacter pylori* [2] y el 3 de octubre de 2005, la Asamblea Nobel le concedió a estos investigadores el Premio Nobel en Fisiología o Medicina por el descubrimiento de *H. pylori* y su papel en la gastritis y la úlcera péptica.

El descubrimiento de *H. pylori* y su asociación con la infección persistente y estas enfermedades fue tomado con escepticismo al principio, sin embargo, los estudios que se han realizado al respecto han revolucionado la manera de entender la enfermedades pépticas y han permitido que los tratamientos médicos sean más efectivos.

Generalidades

H. pylori es una bacteria flagelada, de forma espiral, Gram negativa, microaerofílica, de lento crecimiento, cuyo principal reservorio es el estómago humano, se localiza principalmente en la superficie del epitelio gástrico, en las regiones del antro y píloro. Se caracteriza por sobrevivir en condiciones de pH ácido gracias a la potente enzima ureasa. *H. pylori* es probablemente la infección bacteriana más común en los humanos, presente en la mitad de la población mundial. La presencia de esta bacteria se asocia con gastritis crónica activa, úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico y linfoma MALT [3]. La prevalencia de la

infección depende de factores socioeconómicos y de la infraestructura sanitaria, calculándose que en países en desarrollo la incidencia puede llegar al 90%; en México se ha reportado una seroprevalencia del 66% [4]. Por lo que las enfermedades producidas por la bacteria representan un problema de salud mundial.

Con la secuenciación de su genoma completo se han comprendido mejor su metabolismo y patogénesis [5]. Se han identificado más de 300 genes involucrados en el éxito de la colonización del ambiente ácido del estómago humano, medio hostil para la mayoría de los organismos [6], entre ellos adhesinas, lipoproteínas y otras proteínas de membrana externa, recalcando la complejidad de la interacción patógeno-huésped.

Se sabe que existen al menos 20 adhesinas que permiten la íntima interacción de la bacteria con la célula gástrica [7], dos de ellas han sido exhaustivamente analizadas; SabA, que interactúa con ácido siálico, y BabA, que se une con los azúcares presentes en los antígenos Lewis B [8, 9]. La adhesión de la bacteria a la mucosa gástrica está mediada por glicoconjugados y constituyen un paso determinante en su establecimiento.

Factores de virulencia.

Esta bacteria se ha especializado para vivir y persistir en un ambiente hostil como lo es el estómago humano, para lograrlo, emplea distintos factores de virulencia (Fig. 1) entre los que se encuentran:

Enzima Ureasa. Codificada por un conjunto de genes, cataliza una reacción donde la urea producida por nuestro organismo es convertida en NH_3 y CO_2 , aumentando el pH alrededor de la bacteria, así como del periplasma creando un ambiente alcalino, que protege a la bacteria del ácido gástrico. Además, se tiene evidencia que esta enzima provoca apoptosis en células gástricas *in vitro* [10].

Citotoxina vacuolizante Vac A. Es una proteína que forma poros en las células epiteliales del estómago, permitiendo la salida de aniones y urea. Otras funciones que se le han propuesto son la desorganización de la polaridad celular, promueve la apoptosis de células epiteliales e inhibe la proliferación de las células T y sus funciones efectoras. Todas las cepas de *H. pylori* tienen el gen que codifica para Vac A, sin embargo, variantes en la secuencia de algunos de sus

dominios están ligadas a variaciones en la severidad de las enfermedades provocadas por *H. pylori* [11].

Productos de genes de la isla de patogenicidad cagPAI. Este segmento del genoma tiene 31 genes dentro de los cuales destaca el que codifica para la proteína Cag A, la cual después de ser transportada por un sistema de secreción tipo IV (también codificado por la isla) a las células epiteliales del hospedero, induce en ellas múltiples cambios en el citoesqueleto, activan a las proteínas cinasas activadoras de mitosis MAPK, que regulan la proliferación celular, diferenciación, respuestas inflamatorias y finalmente conducen a apoptosis. No se conocen proteínas homólogas a esta en otras especies de *Helicobacter*, lo cual indica una alta especificidad de infección a los humanos. Las cepas de *H. pylori* que expresan Cag A se asocian con un incremento de riesgo de cáncer gástrico [12].

Lipopolisacárido. El lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa de *H. pylori*, es otro mediador de la inflamación y respuesta inmune del hospedero, debido a la activación de células fagocíticas, endoteliales, epiteliales y linfocitos. Posee antígenos Lewis X y Y como componentes del antígeno O del propio LPS, con los que mimetiza a las células del hospedero y logra evitar su eliminación [13].

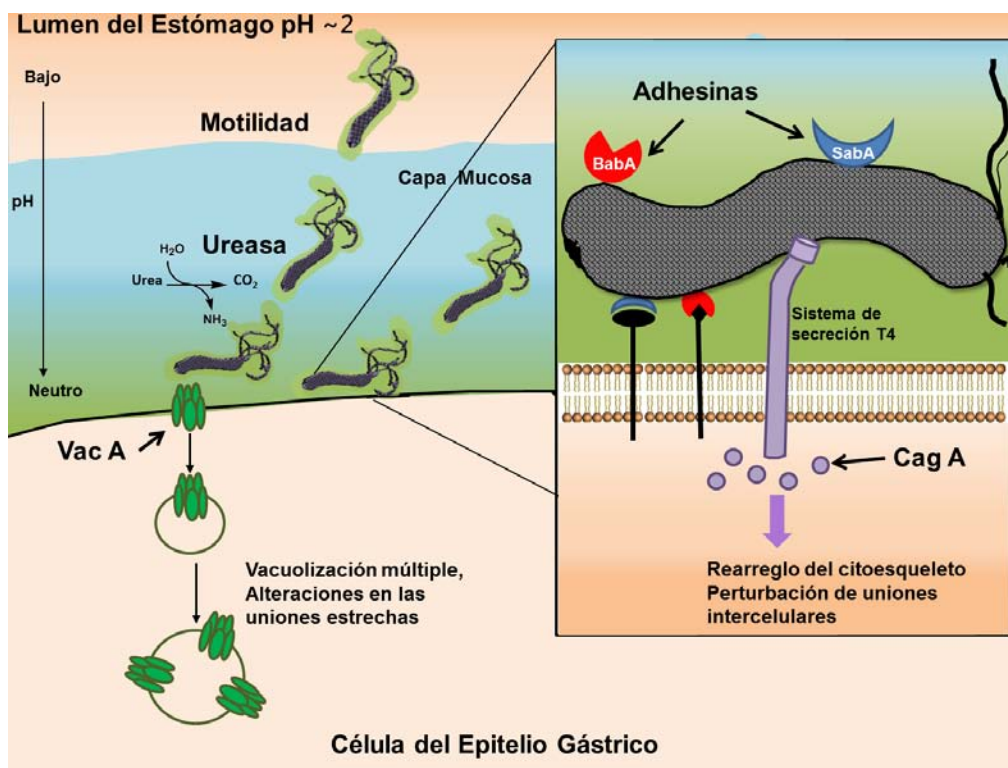


Figura 1. Mecanismos de colonización y factores de virulencia de *H. pylori*

Respuesta del Huésped.

En prácticamente todas las personas infectadas, *H. pylori* provoca un proceso inflamatorio en la mucosa gástrica. Esta respuesta consiste en el reclutamiento de neutrófilos, seguida de linfocitos T y B, células plasmáticas, y macrófagos junto al daño celular. *H. pylori* ha evolucionado por medio de complejas estrategias para mantener una inflamación moderada en la mucosa gástrica, limitando la magnitud de la actividad efectora del sistema inmune del hospedero y evadiéndola [14].

La respuesta inmune del hospedero frente *H. pylori* es, en principio, semejante a la que se da ante cualquier patógeno, una respuesta innata inespecífica que responde rápidamente contra diversas moléculas bacterianas, para eliminar a la bacteria y una adaptativa retardada, que permite la activación de células T- o B- y de memoria mediante la producción de inmunoglobulinas (lo que se define como del tipo celular y del tipo humoral, respectivamente) y es activada por la respuesta innata. Sin embargo, esta bacteria logra evadir de varias maneras a la respuesta innata del hospedero. Por un lado, el LPS y la flagelina de *H. pylori* son activadores pobres de los receptores del reconocimiento del huésped TLR-4 y

TLR- 5, respectivamente, a diferencia de los de otras bacterias Gram negativas [15]. Por otra parte, *H. pylori* puede sobrevivir intracelularmente dentro de los macrófagos, interfiriendo con el efecto de las enzimas lisosomales [16]. Por lo tanto, a pesar de darse una respuesta innata contra la bacteria, esta no es lo suficientemente efectiva para eliminar la infección.

El sello distintivo de la interacción entre *H. pylori* y el sistema inmune del huésped es la persistencia de la infección por años, lo que lleva a una inflamación crónica de la mucosa gástrica. Una vez establecida la infección por *H. pylori*, la inmunidad adaptativa se desarrolla: las células T cooperadoras o Th (del inglés *T helper*) CD4+ se diferencian en células Th efectoras (respuesta celular) y las células B, que producen anticuerpos específicos, se activan (respuesta humoral). Sin embargo, hay evidencia que indica que las células B y los anticuerpos son prescindibles para el control de *H. pylori*, mientras que los subconjuntos de células T efectoras, Th1 y Th17 y sus citocinas, son esenciales para el control de la infección. Las células Th1 producen las citocinas pro-inflamatorias interferón gamma (IFN- γ) y los factores de necrosis tumoral α y β que estimulan la respuesta inmunitaria innata y de las células T. Las células Th17 son una clase, recientemente identificadas, de las células T efectoras que producen la citocina pro-inflamatoria IL-17. Esta interleucina estimula a los fibroblastos, a las células endoteliales y epiteliales y a las células mononucleares de la lámina propia y gástricas para producir una diversidad de citocinas y quimiocinas; este proceso da como resultado la infiltración de neutrófilos que contribuye a la inflamación asociada a *H. pylori* [15]. A pesar de la respuesta local y sistémica contra la infección, *H. pylori* puede trastornar y/o modular la inmunidad adaptativa perpetuando la infección y la inflamación crónica.

Las células T reguladoras (Treg) son células T CD4+ CD25+ FOXP3 que contribuyen a la tolerancia inmunológica periférica mediante la supresión de las células T activadas, células asesinas naturales, células B y células dendríticas. Las células Treg son inducidas por la IL-18 en respuesta a *H. pylori* y regulan a las células T efectoras para evitar la activación excesiva y promover una infección persistente [14].

Además de sobrevivir a la respuesta inmune innata, *H. pylori* también ha evolucionado para enfrentar la respuesta adaptativa y es capaz de bloquear la proliferación de células T dependiente de antígenos, mediante la producción de Vac A, interfiriendo con la vía de señalización de IL-2. También se propone que este efecto inmunomodulador involucra la interacción directa con las células T y

con una interferencia de Vac A con la presentación de antígeno, mediada por el complejo principal de histocompatibilidad II [11,15].

Consecuencias clínicas de la infección.

Aunque aproximadamente la mitad de la población humana esta colonizado por *H. pylori*, la gran mayoría de los infectados será asintomático y no tendrá ningún tipo de complicaciones clínicamente significativas. Sólo alrededor del 10 al 20% son propensos a desarrollar úlcera péptica (duodenales o gástricas), del 1 al 3% están en riesgo de cáncer gástrico y menos del 0.01% a desarrollar linfoma tipo MALT [17, 18].

El daño básico que media la infección por *H. pylori*, es la **gastritis**, la cual se refiere a una inflamación en la mucosa gástrica, asociada a mecanismos inmunes como ya se mencionó. Muchas personas con gastritis no tienen ningún tipo de síntomas; sin embargo, otras presentan ardor o dolor en la parte superior del abdomen, náuseas, vómitos o inapetencia. Cabe hacer notar que la gastritis aguda puede ser producida por otras causas como los antiinflamatorios no esteroideos, consumo excesivo de irritantes, alcohol o tabaquismo. Si la gastritis es de corta duración, se denomina gastritis aguda, pero cuando la infección por la bacteria persiste (meses e incluso años), se presenta la **gastritis crónica**. La gastritis crónica se caracteriza por el arribo de linfocitos y células plasmáticas a la mucosa, en respuesta a la alta producción de citoquinas durante un periodo prolongado. Está asociada a la atrofia de la mucosa y metaplasia intestinal, pero sin provocar erosiones [3].

La enfermedad ulcerosa péptica se caracteriza por una lesión puntual en la mucosa que se extiende más allá de la *muscularis mucosae* y es secundaria a la secreción gástrica de pepsina y ácido. Se produce daño vascular, que origina isquemia de la mucosa, disminución en el aporte de nutrientes y la formación de radicales libres, que como consecuencia, producen necrosis en el tejido y promueven una respuesta inflamatoria. El cuadro clínico de la úlcera péptica se caracteriza por dolor abdominal de tipo ardoroso y punzante localizado en la boca del estómago, acompañado de sensación de hambre o vacío, náuseas y vómito. Las úlceras pépticas se clasifican en úlceras gástricas y duodenales. *H. pylori* es responsable de casi 95% de las duodenales y de 80 % de las gástricas. Las complicaciones son en el 15-20% de los casos la hemorragia y en el 2-10% la perforación y obstrucción digestiva, las cuales, de no tratarse a tiempo resultan mortales para el paciente [3].

En la menor parte de los infectados por *H. pylori* se desarrolla **cáncer gástrico**, que es un tipo de crecimiento celular maligno que se origina en el epitelio del estómago, con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos y órganos. A nivel mundial es la 6ª neoplasia maligna más común y la 3ª causa de muerte por cánceres [19]. El adenocarcinoma se desarrolla de una secuencia de lesiones que incluyen la inflamación crónica no atrófica (principalmente en el corpus), gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal, displasia y carcinoma. Se caracteriza por hipo y aclorhidria, niveles altos de gastrina y una baja relación de pepsinogeno I/II. Se ha observado que los sujetos que desarrollan úlceras pépticas no llegan a presentar cáncer gástrico, lo que indica caminos divergentes en estas patologías [3].

El riesgo, de desarrollar alguna de estas patologías en los pacientes infectados varía ampliamente en el tipo de población que se trate y dependerá principalmente de factores inherentes de la cepa bacteriana y de factores del hospedero como su fisiología, genética y hábitos (dieta, ingesta de alcohol y tabaquismo) [18]. Sin embargo, no todas las cepas de *H. pylori* son patógenas, se ha observado que algunas evitan la aparición de enfermedades gástricas superiores, como reflujo, cáncer de esófago y síndrome de Barrett; pero el uso desmedido de antibióticos ha provocado la selección de cepas patógenas [20].

Tratamiento de la Infección.

Actualmente no se tiene una vacuna contra *H. pylori* por lo que no existe una guía para la prevención de la infección, a excepción de las normas básicas de higiene.

El tratamiento de primera elección para erradicar a *H. pylori* es la Triple Terapia integrada por un inhibidor de la bomba de protones y 2 antibióticos (a elegir de amoxicilina, claritromicina, metronidazol o tetraciclina) por 7 a 14 días. Esta terapia falla en más del 20%, principalmente debido a la resistencia de la bacteria frente a dichos antibióticos [3,18]. En la 2ª línea de tratamiento (Terapia Cuádruple) se utilizan 2 antibióticos diferentes a los utilizados en la primera, un inhibidor de la acidez y se adicionan sales de bismuto, administrados hasta por 21 días. En aquellos pacientes en los que la infección por *H. pylori* persiste tras un segundo curso de tratamiento los antibióticos alternativos para una 3ª línea de tratamiento son las quinolonas (levofloxacina, moxifloxacina), rifabutina y furazolidona [18, 21].

Debido a la complejidad de las terapias (3 o 4 fármacos administrados en repetidas dosis, durante un largo periodo de tiempo) y a que, generalmente tienen

efectos adversos, el paciente no llega a cumplir adecuadamente el tratamiento, provocando la aparición de resistencia a los antibióticos utilizados y disminuyendo sustancialmente la eficacia de la terapia. Por otra parte, y debido a las pobres condiciones sanitarias en los países en vías de desarrollo, el tratamiento presenta aún más dificultades debido a la recurrencia después de una terapia exitosa. Finalmente, el alto costo de la terapia anti-*H. pylori* puede implicar un gasto difícil de solventar para el paciente, conduciendo a la evolución de la infección en padecimientos más severos como la úlcera péptica y el cáncer [22].

De tal manera que es importante buscar nuevos tratamientos y/o compuestos para controlar estas enfermedades, que sean más específicas, menos tóxicas y de fácil acceso a la población.

Plantas en el tratamiento para las enfermedades producidas por *H. pylori*

Los productos naturales, en particular los de las plantas, han desempeñado un papel fundamental para el desarrollo de fármacos. Por muchos años, la medicina tradicional ha utilizado diversas plantas para tratar la úlcera y la gastritis y este conocimiento ha sido la base para la búsqueda de agentes derivados de plantas para tratar dichas enfermedades.

Nuestro grupo de investigación ha sido pionero en el estudio de la actividad anti-*H. pylori in vitro* de las plantas medicinales mexicanas con el objetivo de usar los extractos o compuestos aislados de las mismas, como posibles fármacos para el control de las enfermedades asociadas a esta bacteria.

Hemos analizado los extractos acuosos y metanólicos de 60 plantas y los resultados indicaron que el 77% de ellas tienen actividad contra *H. pylori*, en al menos uno de los extractos ensayados [23]. Una vez identificadas las plantas con mayor actividad antibiótica, se continuó con su estudio, por una parte, tratando de aislar los compuestos activos contra la bacteria y por el otro, estudiando los extractos de una manera integral, es decir si, además de tener actividad contra *H. pylori*, tienen otros efectos polifarmacológicos.

Por otra parte, y debido a que hasta la fecha no hay una vacuna contra *H. pylori*, se está investigando el efecto de los extractos y compuestos de las diferentes plantas en la inhibición de los procesos de colonización de esa bacteria, con lo cual se estaría incidiendo en la prevención o profilaxis de los padecimientos

que ocasiona. A continuación se presentan algunos de los resultados que hemos obtenido en cada una de estas líneas de trabajo.

1. Compuestos con actividad antibiótica.

Se ha logrado la identificación de compuestos con actividad antibiótica contra *H. pylori* (Fig. 2). La primera planta que se estudió fue el “cuachalalate”, *Amphipterygium adstringens*, debido a que es una de las especies más sobrecomercializadas y valoradas en nuestro país para el tratamiento de gastritis, ulcera péptica y cáncer gástrico [24]. A partir de su corteza se aislaron e identificaron a los ácidos anacárdicos como sus principales compuestos activos contra la bacteria [25]. Por otra parte, a partir de las partes aéreas de *Artemisia ludoviciana*, conocida como “estafiate”, se aislaron el flavonoide eupatilina [26] y la lactona sesquiterpénica, estafiatina [27]. Finalmente, de *Cyrtoarpa procera* comúnmente conocida como “chupandilla”, se aisló el β -sitosterol y una mezcla muy interesante de ácidos grasos que incorporan ciclopropano en su estructura [28], que actualmente se está terminando de caracterizar.

Todos estos compuestos presentan actividades inhibitorias del crecimiento de *H. pylori* mejores que el antibiótico metronidazol [Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de entre 10 y 31.2 $\mu\text{g/ml}$, comparadas con 250 $\mu\text{g/ml}$ del metronidazol] por lo que son moléculas que tienen el potencial para utilizarse como antibióticos en las terapias contra las enfermedades producidas por *H. pylori*. Este es el primer reporte de la actividad anti-*H. pylori* de estos compuestos aislados.

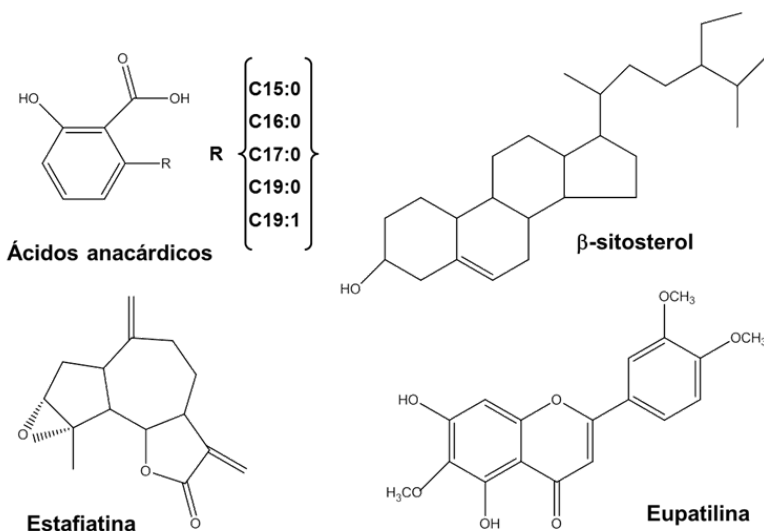


Figura 2. Compuestos con actividad anti-*H. pylori* aislados de plantas medicinales.

2. Extractos.

Se han identificado algunos extractos con propiedades polifarmacológicas, destacándose *Cyrtocarpa procera* [29]. Esta, es una especie endémica de México cuya corteza se emplea desde tiempos prehispánicos, en forma de decocción, para el tratamiento de padecimientos gastrointestinales, como la gastritis y la úlcera péptica [24]. Más recientemente, se ha reportado su uso como adulterante del cuachalalate [30].

A partir de la corteza de *C. procera*, se obtuvieron 5 distintos extractos [hexánico, diclorometánico, diclorometánico-metanólico 1:1, metanólico y acuoso], para abarcar toda la gama de polaridades y así obtener la mayor información posible acerca de los compuestos contenidos en la misma. A cada uno de ellos se le determinó su actividad anti-*H. pylori* y se evaluó su efecto en los siguientes modelos murinos agudos: toxicidad mediante la prueba de Lorke, úlcera inducida por etanol absoluto y edema auricular inducido por TPA [29] (Tabla I).

El análisis de resultados, permitió concluir que el extracto hexánico posee todas las actividades esperadas, sin embargo, una limitante para continuar su estudio es su bajo rendimiento. Por otro lado, el extracto metanólico posee la mejor actividad gastroprotectora, una buena actividad anti- *H. pylori*, y sobre todo, un buen rendimiento (13.2%), por lo que se continuó con su estudio.

Tabla I. Efectos farmacológicos de los extractos de *C. procera*

Extracto	Rendimiento (% peso seco)	ACTIVIDAD			
		Toxicidad aguda DL ₅₀ (mg/kg)	Anti- <i>H. pylori</i> (CMI µg/mL)	Antiinflamatoria DE ₅₀ (mg/oreja)	Gastroprotectora DE ₅₀ (mg/kg)
Hex	0.90	>5,000	7.81	1.75	1.06
DM	1.07		15.6	> 3	> 300
DM-Met	12.80		62.5	> 1	> 300
Met	13.22		62.5	> 1	0.53
Acuoso	17.74		125	> 1	11.30
Controles Positivos de Referencia			Metronidazol: 300 Claritromicina: 0.5 Amoxicilina: 0.05	Dexametasona: 0.05 Indometacina: 0.5	Carbenoxolona: 0.24

Hex: hexánico, DM: diclorometánico, DM-Met: diclorometánico-metanólico (1:1), Met: metanólico. En cuadros sombreados se presentan los resultados sobresalientes. Modificada de [29].

Se determinó que el mecanismo de gastroprotección del extracto metanólico de *C. procera* está mediado principalmente por la participación del óxido nítrico actuando sobre la vascularización de la mucosa gástrica, además de que se suma la participación parcial de otros mecanismos como las prostaglandinas con la concomitante producción de moco gástrico, los grupos sulfhidrilo y los canales de potasio dependientes de ATP [28].

Así mismo, se evaluó el efecto resolutorio del extracto metanólico sobre la úlcera gástrica inducida por etanol a ratones. Los resultados de administrar por 20 días el extracto, mostraron que es capaz de lograr un incremento significativo en la resolución de la úlcera, disminuyendo tanto en el número como la longitud de las úlceras (Fig. 3), resultados comparables con los obtenidos con el fármaco de referencia carbenoxolona. Así mismo, el análisis histopatológico e histoquímico fue confirmatorio para el efecto resolutorio [28].



Figura 3. Efecto resolutorio de la úlcera del extracto metanólico de *C. procera*. Las flechas en el control negativo indican las lesiones ulcerosas provocadas por la administración de etanol (Tomado de [28])

En resumen, los resultados obtenidos hasta el momento, destacan el potencial preclínico de *C. procera*, y en particular de su extracto metanólico, para reconocerla como candidata prometedora para el desarrollo de un tratamiento

integral para la gastritis o úlcera péptica, relacionados o no con *H. pylori*. Así mismo, estos resultados contribuyen a validar su uso tradicional.

3. Efecto de extractos sobre los factores de colonización de *H. pylori*.

Se ha analizado el efecto de los extractos de *Parthenium hysterophorus* sobre los factores de colonización de *H. pylori*. Esta especie es una hierba mexicana que se conoce con diversos nombres, entre ellos “chuchuiate” y su raíz se emplea como remedio para tratar la gastritis. Por esta razón se analizó su efecto separando la raíz y la parte aérea de la planta.

Se obtuvieron extractos de la planta bajo una amplia gama de polaridad y se midió, en primer lugar, su efecto directo en el crecimiento de *H. pylori in vitro*. Se encontró que los extractos no polares tuvieron un mayor efecto inhibitorio sobre la bacteria (Tabla II).

Posteriormente se evaluó su efecto sobre la actividad de la ureasa mediante la cuantificación colorimétrica del amonio producido a través de la reacción de Berthelot y su efecto sobre la adherencia de *H. pylori* a células de adenocarcinoma gástrico (AGS) [31]. En éste método se marcan a las bacterias con el fluoróforo, isotiocianato de fluoresceína (FITC) y posteriormente se incuban con las células AGS para determinar el porcentaje de adherencia a las mismas.

Los resultados obtenidos (Tabla II) demostraron que, en general, los extractos de la planta logran inhibir en promedio un máximo del 40% de la actividad de la ureasa de *H. pylori*. En cuanto a la actividad anti-adherente, los extractos logran inhibir parcialmente la interacción de *H. pylori* con las células. Sin embargo, sobresalen los extractos de diclorometano-metanol de raíz y de parte aérea (DM-MetR y DM-MetPA) que tienen un efecto concentración dependiente, obteniéndose el 50% de la inhibición con 0.5 mg/ml de DM-MetR y 0.25 mg/ml de DM-MetPA. Logrando un máximo de inhibición de la adherencia del 70% a 1 mg/ml. Con estos resultados alentadores, se realizó un fraccionamiento primario del extracto DM-MetPA por partición líquido-líquido con metanol-agua 8:2 y hexano. Las fracciones resultantes incrementaron el efecto anti-adherente hasta en un 90% (Fig. 4) y con solo 0.025 mg/ml se inhibió el 50% de la adherencia. Esta actividad antiadherente es muy importante considerando que la adherencia de la bacteria esta mediada por múltiples adhesinas. Actualmente se está trabajando para tratar de identificar los compuestos responsables de la actividad.

Tabla II. Efecto de los extractos de *P. hysterophorus* sobre mecanismos de colonización de *H. pylori*.

EXTRACTO	RAÍZ			PARTE AÉREA		
	Anti- <i>H. pylori</i>	Anti-ureasa	Anti-adherencia	Anti- <i>H. pylori</i>	Anti-ureasa	Anti-adherencia
	CMI (µg/ml)	(µg/ml=% I)	(µg/ml=%I)	CMI (µg/ml)	(µg/ml=% I)	(µg/ml=%I)
Hex	31.25	125=37.5%	1000=49.9%	62.5	250=47.5%	1000=41%
DM	31.25	500=73.8%	1000=28.6%	31.25	125=38.3%	1000=24.1%
DM-Met	125	500=43.5%	1000=68.0%	62.5	62.5=49.3%	1000=73.1%
Met	125	500=40.1%	1000=53.8%	125	125=42%	1000=41%
Acuoso	>250	62.5=19.1%	1000=8.9%	>250	250=32.3%	1000=33.3%

Hex: hexánico, DM: diclorometánico, DM-Met: diclorometánico-metanólico (1:1), Met: metanólico. %I= %Inhibición. En cuadros sombreados se presentan los resultados sobresalientes.

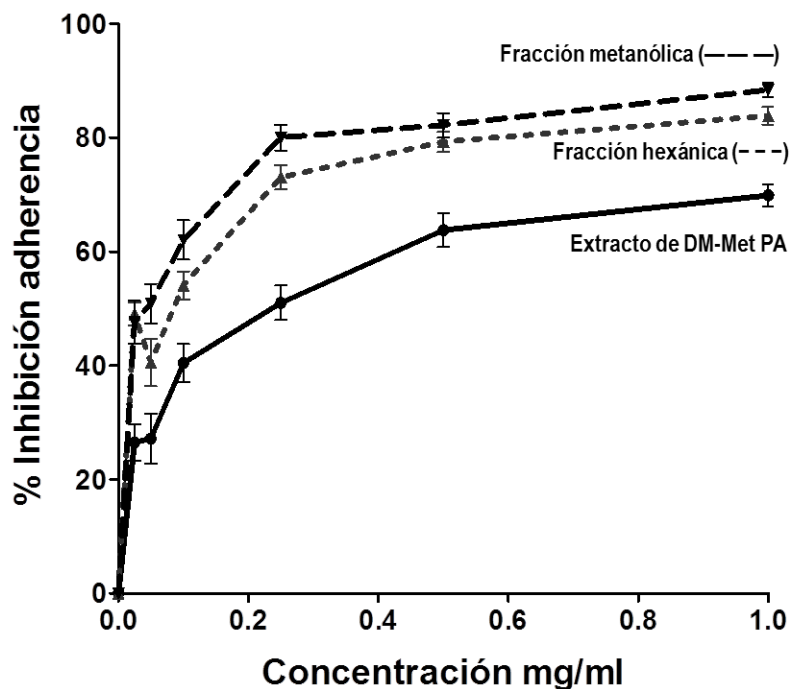


Figura. 4. Actividad anti-adherente del extracto de DM-Met PA de *P. hysterophorus* y sus fracciones.

Como puede apreciarse, los resultados de nuestras investigaciones hasta el momento, nos conducen por dos caminos. Por un lado, el estudio del efecto de los extractos polifarmacológicos y de los compuestos aislados sobre la resolución de las patologías producidas por *H. pylori* en modelos animales; y por otro, el estudio *in vitro* del mecanismo de acción de los mismos, sobre la bacteria.

En conclusión, las plantas medicinales resultan una fuente de recursos a utilizarse en las terapias asociadas con las enfermedades producidas por *H. pylori*.

Agradecimientos. Parte de las investigaciones se realizaron gracias al Programa UNAM-DGAPA-PAPIIT IN216414.

Referencias

1. Warren, J.R., Marshall, B. (1983) *Lancet*. **321**, 1273-1275
2. Goodwin, C.S., Armostrong, J.A., Chilvers, T., et. al. (1989) *Int. J. Syst. Bacteriol.* **4**, 397-405
3. Atherton, J.C. (2006) *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **1**, 63-96
4. Torres, J., López, L., Muñoz, O. (2005). *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **14**, 1874-1877
5. Tomb, J., White, O., Kerlavage, A. R., et. al. (1997) *Nature*. **388**, 539-547
6. Wen, Y., Marcus, E.A., Matrubutham, U., et. al. (2003) *Infect. Immun.* **71**, 5921-5939
7. Testerman, T. L., McGee, D., J., Mobley, H. L. T. *Adherence and Colonization en Mobley, H., L., T., Mendz, G., L., Hazell, S., L., (2001) Helicobacter pylori. Physiology and genetics, ASM press, Washington DC.*
8. Ilver, D., Arnqvist, A., Ogren, J., et. al., (1998). *Science*. **279**, 373-377
9. Mahdavi, J., Sondén, B., Hurtig, M., et. al. (2002) *Science*. **297**, 573-578
10. Sachs, G., Weeks, D.L., Wen, Y., et. al. (2005) *Physiology*. **20**, 429-438
11. Isomoto H., Moss J., Hirayama T. (2010) *Tohoku J. Exp. Med.* **22**, 3-14
12. Tegtmeyer, N., Wessler, S., Backert, S. (2011) *FEBS J.* **278**, 1190-1202
13. Monteiro, M.A., Chan, K.H., Rasko, D.A., et. al. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 11533-11543
14. Algood, H.M., Cover, T.L. (2006) *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 597-613
15. Salama, N.R., Hartung ML., Müller A. (2013) *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 385-399
16. Allen, L.A., Schlesinger, L.S., Kang, B. (2000). *J. Exp. Med.* **191**, 115-128
17. IARC (International Agency for Research on Cancer). (1994). Live flukes and *Helicobacter pylori*. IARC. Working group on the evaluation of Carcinogenic Risks to Human, Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks. Hum.* **61**, 1-241

18. Kusters, J.G., van-Vliet, A.H., Kuipers, E.J. (2006) *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 449-490
19. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., et. al. (2013) GLOBOCAN 2012 v1.0 Cancer Incidence and Mortality Worldwide. International Agency for Research on Cancer. <http://globocan.iarc.fr>, acceso 015/01/2014
20. Blaser, M.J. (2008). *Can. Prev. Res.* **1**, 308-311
21. Vakil, N., Megraud, F. (2007) *Gastroenterology.* **133**, 985-1001
22. De Francesco, V., Ierardi, E., Hassan, C., Zullo, A. (2012) *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.* **6**, 68-73
23. Castillo-Juárez, I., González, V., Jaime-Aguilar, H., et. al. (2009) *J. Ethnopharmacol.* **122**, 402-405
24. Argueta, V., Cano, J., Rodarte, M., (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana, Vol. I, Instituto Nacional Indigenista, México.
25. Castillo-Juárez, I., Rivero-Cruz, F., Celis, H., et. al. (2007) *J. Ethnopharmacol.* **114**, 72-77
26. Cortés, A. (2012) Estudio del efecto anti-*Helicobacter pylori* del extracto acuoso de *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
27. Borja, E. (2013) Compuestos anti-*Helicobacter pylori* y gastroprotectores de la fracción de acetato de etilo del extracto acuoso de *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM
28. Escobedo-Hinojosa, W.I., (2013) Estudio del potencial anti-*Helicobacter pylori*, gastroprotector y antiinflamatorio de *Cyrtocarpa procera*. Tesis de Doctorado, Facultad de Medicina, UNAM, México, D. F.
29. Escobedo-Hinojosa, W.I, Díaz del Carpio, J., Palacios-Espinosa, J.F., Romero, I. (2012) *J. Ethnopharmacol.* **143**, 363-371
30. Hersch-Martinez, P. (1995). *Econ. Bot.* **49**, 197-206
31. Beil, W., Kilian, P. (2007) *Phytomedicine* **14**, 5-8