

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Estudio de la actividad anti-*Helicobacter pylori* de dos plantas asociadas a *Amphipterygium adstringens*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

BEATRIZ REYES GARCÍA

TUTORES:

DRA. IRMA ROMERO ÁLVAREZ
BIÓLOGO ISRAEL CASTILLO JUÁREZ



2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



El presente trabajo se realizó en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la U.N.A.M.

1. Datos del alumno

Reyes

García

Beatriz

57314038

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

301252146

2. Datos de los tutores

Dra.

Romero

Álvarez

Irma

Biólogo

Castillo

Juárez

Israel

3. Datos del sinodal 1

M. en C.

Linares

Mazari

Edelmira

4. Datos del sinodal 2

M. en C.

Escobedo

Martínez

Silvia

5. Datos del sinodal 3

M. en C.

Fonseca

Juárez

Rosa María

6. Datos del trabajo escrito

Estudio de la actividad anti-*H. pylori* de dos plantas asociadas a
Amphipterygium adstringens

91 p.

2008



FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

Estudio de la actividad anti-Helicobacter pylori de dos plantas asociadas a Amphipterygium adstringens

realizado por Reyes García Beatriz con número de cuenta 3-0125214-6 quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario	M. en C. María Edelmira Linares Mazarí	<i>Mra. Edelma Linares Mazarí</i>
Propietario	M. en C. Silvia Escobedo Martínez	<i>Silvia Escobedo M.</i>
Propietario Tutora	Dra. Irma Romero Álvarez	<i>Romero</i>
Suplente	M. en C. Rosa María Fonseca Juárez	<i>R. J.</i>
Suplente	Biól. Israel Castillo Juárez	<i>Castillo</i>

Atentamente,

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU."

Ciudad Universitaria, D. F., a 17 de febrero de 2009

El COORDINADOR DEL COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

DR. PEDRO GARCÍA BARRERA

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a aquellas personas que hicieron posible que se concluyera este trabajo:

Al Biólogo Israel Castillo Juárez, por brindarme su apoyo, su conocimiento y confianza.

A la Dra. Irma Romero Álvarez por la formación que me ha dado tanto profesional como personal, por su atención, orientación y paciencia.

A la M. en C. Edelmira Linares por su ayuda en la identificación de plantas y sus comentarios para la tesis.

A la M. en C. Silvia Escobedo y al Dr. Heliodoro Celis por ayudarme en el camino para realizar un buen trabajo en el Laboratorio.

A la M. en C. Rosa María Fonseca por brindarme sugerencias para mi desarrollo profesional.

A la Bióloga Gisela Martínez por su orientación y amistad.

Apoyo de Beca Tesis de DGAPA-UNAM (IN-218108).

DEDICATORIAS

A una gran mujer que es mi mamá Elvia García por enseñarme a trabajar y darme su apoyo incondicional.

A mis hermanos: Adán, Vero y Emma, que siempre han cuidado de mí.

A mis sobrinos Edwin y Axel por llenarme de alegría cada día de mi vida.

A mis abuelitos Candido García[†] y Modesta Vitinio, por su calidez y el amor que me han dado.

A mi amiga Anabel Palacios por apoyarme siempre.

A mis buenos amigos y compañeros que estuvieron en tiempos felices y difíciles de mi vida y con quiénes compartí grandes experiencias en la Facultad de Ciencias a lo largo de la carrera: Diana, Kareen, Ere, Macario, Graciela, Margarita, Jorge, Giovanni, Violeta y Erika.

INDICE

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	2
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	
1.1. <i>Helicobacter pylori</i>	3
1.1.1. Taxonomía.....	4
1.1.2. Morfología.....	4
1.1.3. Especies patógenas de <i>Helicobacter</i>	5
1.1.4. Modo de transmisión y reservorios.....	7
1.1.5. Epidemiología: prevalencia y distribución geográfica.....	8
1.1.6. Factores de virulencia.....	9
1.1.7. Enfermedades asociadas a <i>H. pylori</i>	12
Gastritis aguda.....	12
Gastritis crónica.....	13
Úlcera crónica atrófica.....	13
Metaplasia intestinal.....	14
Displasia epitelial gástrica.....	14
Cáncer gástrico.....	15
Linfoma gástrico tipo MALT.....	15
1.1.8. Terapia de erradicación y resistencia a antibióticos.....	16
1.2. Plantas medicinales y <i>H. pylori</i>	17
1.3. Integrantes del “complejo cuachalalate” y/o plantas asociadas.....	19
1.3.1 Cuachalalate rojo.....	20
1.3.1.1. Taxonomía.....	20
1.3.1.2. Nombres comunes.....	21
1.3.1.3. Descripción.....	21
1.3.1.4. Distribución.....	22
1.3.1.5. Uso etnobotánico.....	23
1.3.1.6. Modo de empleo.....	25
1.3.1.7. Compuestos aislados.....	26
1.3.1.8. Actividad biológica y efectos sinérgicos.....	27
Antitumoral.....	28
Antiulcerogástrico.....	28
Antiinflamatorio.....	29
Antimicrobiano.....	29
Antifúngico.....	29
Cicatrizante.....	29
1.3.2. Cuachalalate blanco.....	30
1.3.2.1. Taxonomía.....	30
1.3.2.2. Nombres comunes.....	30

1.3.2.3. Descripción.....	31
1.3.2.4. Distribución.....	32
1.3.2.5. Uso etnobotánico.....	32
1.3.2.6. Modo de empleo.....	33
1.3.2.7. Efecto biológico.....	34
1.3.3. Chupandilla.....	34
1.3.3.1. Taxonomía.....	34
1.3.3.2. Nombres comunes.....	34
1.3.3.3. Descripción.....	35
1.3.3.4. Distribución.....	36
1.3.3.5. Uso etnobotánico.....	36
1.3.3.6. Modo de empleo.....	37
1.3.3.7. Compuestos aislados.....	38

CAPÍTULO 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1. Justificación.....	38
2.2. Objetivo general.....	40
2.2.1. Objetivos particulares.....	40

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención del material biológico.....	41
3.2. Crecimiento de <i>H. pylori</i>	42
3.2.1. Pruebas de identificación de <i>H. pylori</i>	44
3.3. Obtención de los extractos.....	45
3.3.1. Extracto acuoso (EA).....	45
3.3.2. Extracto metanólico (EM).....	45
3.3.3. Extracto hexánico (EH).....	45
3.4. Actividad anti- <i>H. pylori in vitro</i> de los extractos (acuoso y metanólico)...	46
3.5. Métodos de separación.....	47
3.5.1. Método de “raspado de placas de cromatografía”.....	50

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

4.1. Rendimiento de los extractos acuosos y metanólicos.....	51
4.2. Actividad anti- <i>H. pylori in vitro</i> de los extractos acuosos y metanólicos.	52
4.3. Análisis comparativo de los extractos acuosos, metanólicos y hexánicos de las plantas estudiadas.....	54
4.4. Análisis comparativo de los extractos hexánicos de cuachalalates procedentes de diferentes localidades.....	55
4.5. Actividad anti- <i>H. pylori in vitro</i> de los compuestos del cuachalalate blanco y la chupandilla.....	57
4.5.1. Compuestos aislados del cuachalalate blanco y su actividad anti- <i>H. pylori</i>	57

4.5.2. Compuestos aislados de la chupandilla y su actividad anti- <i>H. pylori</i>	60
<u>CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN</u>	63
<u>CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES</u>	70
5.1 Perspectivas.....	71
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	72
<u>ANEXO 1</u>	83
CCF de las muestras de referencia.....	84
Metronidazol.....	84
Ácidos anacárdicos.....	86
Amoxicilina.....	87
Ácido masticadienónico.....	88
Determinación de la actividad anti- <i>H. pylori in vitro</i> de las muestras de referencia recuperadas de la CCF.....	90

ABREVIATURAS

MO	El Herbario del Jardín Botánico de Missouri
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosa
IBP	Inhibidores de la bomba de protones
EA	Extracto acuoso
EM	Extracto metanólico
EH	Extracto hexánico
msn	Metros sobre el nivel del mar
<i>glnA</i>	Glutamina sintetasa
<i>cagA</i>	Gen asociado a la citotoxina
<i>vacA</i>	Gen que codifica para la citotoxina vacuolizante
UFC	Unidades formadoras de colonias
CCF	Cromatografía en capa fina
CC	Cromatografía en columna
PC	Patrón cromatográfico
cuacha-R	Cuachalalate rojo
cuacha-B	Cuachalalate blanco
DMSO	Dimetilsulfoxido

RESUMEN

La bacteria *Helicobacter pylori* es reconocida como el principal agente causal de la gastritis crónica activa y de la úlcera péptica. Las terapias que se utilizan para el tratamiento de las enfermedades causadas por esta bacteria no son efectivas en un 20% de los casos, debido principalmente a la resistencia que las bacterias han venido desarrollando a los antibióticos ya existentes, así mismo, estas terapias producen efectos secundarios perjudiciales para el organismo. Esto marca la importancia de la búsqueda de fármacos y terapias con actividad anti-*H. pylori* que sean efectivas, de fácil acceso y de menor toxicidad. Dado que la fuente original de muchos fármacos son los productos naturales es importante continuar con estudios fitoquímicos para obtener nuevos compuestos selectivos para el tratamiento de gastritis y úlceras. Una de las plantas más utilizada para el tratamiento de estas enfermedades en México es la corteza de *Amphipterygium adstringens* (cuachalalate rojo) la cual contiene compuestos con propiedades antiinflamatorias, gastroprotectoras y con actividad anti-*H. pylori*. Considerando lo anterior, se decidió estudiar la actividad anti-*H. pylori* de la corteza de dos plantas, que por diversas razones, han sido asociadas al cuachalalate rojo: la corteza de *Guaiacum coulteri* (cuachalalate blanco) y la de *Cyrtocarpa procera* (chupandilla). En primer lugar, se determinó la actividad anti-*H. pylori in vitro* de sus extractos acuosos y metanólicos, encontrando que el extracto acuoso de la chupandilla tuvo la mejor actividad con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 62.5 µg/ml, mientras que el cuachalalate blanco no inhibió a la bacteria. El extracto metanólico del cuachalalate blanco tuvo la mejor actividad con una CMI de <3.95 µg/ml y el extracto metanólico de la chupandilla no tuvo efecto. El análisis cromatográfico de los extractos mostró que las cortezas no presentan los compuestos activos del cuachalalate rojo y su actividad anti-*H. pylori* es debida a compuestos diferentes. También se comparó el patrón cromatográfico de los compuestos activos presentes en cuachalalates procedentes de diferentes localidades de México y se encontró que todos ellos presentan los mismos compuestos activos independientemente de su procedencia. En conclusión, podemos decir que las plantas estudiadas tienen una buena actividad anti-*H. pylori*, por lo menos en alguno de los extractos analizados, los compuestos de referencia del cuachalalate rojo no se encuentran en las plantas asociadas a esta, pero si se encontraron otros que presentaron una actividad anti-*H. pylori*.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCION

1.1 *Helicobacter pylori*

El primer informe conocido de un *Helicobacter* gástrico es el de Bizzozero en 1893, quien en sus observaciones anatómicas de la mucosa gástrica de perros reporta “espiroquetas” que habitan las glándulas gástricas y que incluso, se encuentran en el canalículo de las células parietales. La bacteria *Helicobacter pylori* ha sido sujeta a intensa investigación desde que fue cultivada por Barry Marshall y Robin Warren de una biopsia gástrica procedente de un paciente con gastritis crónica activa (Warren y Marshall, 1983). Con la auto-ingestión de cultivos de esta bacteria por Marshall (Marshall *et al.*, 1985), Morris (Morris y Nicholson, 1987) y otros voluntarios en posteriores experimentos (Morris *et al.*, 1991), se ha demostrado que esta bacteria puede colonizar el estómago humano e inducir inflamación de la mucosa gástrica.

En la conferencia de consenso llevada a cabo por el Instituto Nacional de la Salud de Estados Unidos en 1994 se declaró a *H. pylori* como la principal causa de úlcera péptica (NIH, 1994). Así mismo, la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer la clasificó como carcinógeno tipo I (IARC, 1994). El premio Nobel en Fisiología o Medicina de 2005 se otorgó a los científicos australianos J. Robin Warren y Barry J. Marshall por el descubrimiento de la bacteria *H. pylori* y su papel en la gastritis y la úlcera péptica (Fig. 1).



Fig. 1. Robin Warren (izquierda) y Barry Marshall

1.1.1. Taxonomía

Inicialmente la bacteria fue colocada dentro del género *Campylobacter* por compartir algunas características tales como: su morfología curveada, su crecimiento en medio rico y en condiciones microaerófilas, no ser sacarolítica, ser sensible a metronidazol y por su contenido de G-C en el DNA (34%). En 1984 se denominó *Campylobacter pyloridis* y poco tiempo después, debido a las reglas internacionales de nomenclatura se cambió a *Campylobacter pylori* (Marshall y Goodwin, 1987).

Posteriormente, estudios de microscopía mostraron que la bacteria presenta múltiples flagelos unipolares, a diferencia de *Campylobacter*; los estudios bioquímicos evidenciaron también diferencias en el tipo de proteínas y de ácidos grasos, y el análisis de secuencia de su RNAr 16s mostró una distancia suficiente como para excluir a la bacteria del género *Campylobacter* (Pearson *et al.*, 1984; Romaniuk *et al.*, 1987). Con esto se forma un nuevo género: *Helicobacter*, donde el primer miembro es *Helicobacter pylori* por su apariencia *in vivo* de hélice y su sitio más común de aislamiento, el píloro del estómago (Goodwin *et al.*, 1989).

1.1.2. Morfología

Helicobacter pylori es una bacteria polimórfica, Gram-negativa que mide de 2 a 4 µm de largo y 0.5 a 1 µm de diámetro (Fig. 2). Además puede presentar la forma cocoide cuando es inducida alguna condición de estrés como el pH alcalino, alta temperatura, aumento en la tensión de oxígeno (O₂), cultivo prolongado o presencia de antibióticos. Actualmente existe controversia sobre si estas formas son viables o no y se plantea que puede ser un mecanismo de resistencia, así como de transmisión de la bacteria (O'Rourke y Bode, 2001). Dispone de 2 a 6 flagelos unipolares que le confieren movilidad, lo que le permite penetrar a través de la mucosa gástrica (Goodwin *et al.*, 1989). Cada flagelo mide 3 µm de largo (Goodwin y Armstrong, 1990).

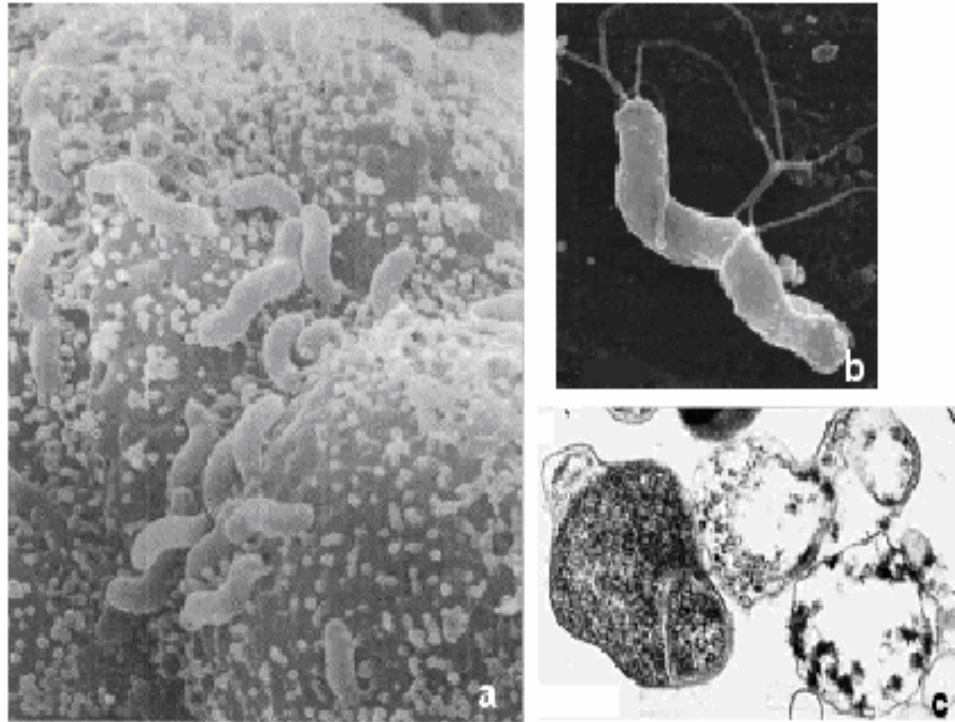


Fig. 2. a) Microscopía electrónica de barrido de la mucosa gástrica con *H. pylori* localizada al frente de las uniones intercelulares; **b)** forma típica de "S" de *H. pylori* con 2 a 6 flagelos inipolares; **c)** conversión a la forma cocoide (O' Rourke y Bode, 2001)

Es un microorganismo de lento crecimiento (3 a 5 días) y en el laboratorio crece en condiciones microaerófilas (O_2 de 2 a 5%; CO_2 entre 5 y 10%) con alta humedad, a 37 °C y a un pH cercano a 7. Requiere medios de cultivo ricos en nutrientes como peptona, triptona, extracto de levadura, glucosa, suplementados con sangre y suero fetal bovino. Las colonias en medio sólido son pequeñas y translúcidas (Dehesa, 1993). En el estómago humano se sitúa en la capa de la superficie epitelial, principalmente en la región del píloro y antro.

1.1.3. Especies patógenas de *Helicobacter*

Actualmente el género *Helicobacter* se compone de 23 especies reconocidas y 2 candidatos propuestos (Don *et al.*, 2005). Los miembros del género *Helicobacter* son organismos microaerófilos que en la mayoría de los casos reaccionan positivamente a catalasa y oxidasa, y gran parte son aureasa positiva. Las especies de *Helicobacter* se subdividen en dos grupos (Tabla 1):

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

Tabla 1. Algunas especies patógenas del género *Helicobacter*

Especies	Principal hospedero mamífero	Patología	Referencia
Gástricas			
<i>H. pylori</i>	Primates, humanos	Gastritis, úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico, linfoma tipo MALT	Kusters <i>et al.</i> , 2006
<i>H. felis</i>	Gatos, perros, ratón	Gastritis en huésped natural, puede causar úlcera péptica o adenocarcinoma en ratón	Kusters <i>et al.</i> , 2006
<i>H. mustelae</i>	Hurón	Gastritis, úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico, linfoma tipo MALT	Kusters <i>et al.</i> , 2006
<i>H. acinonychis</i>	Guepardos, tigres, otros grandes felinos	Gastritis, úlcera péptica	Kusters <i>et al.</i> , 2006
<i>H. heilmannii</i>	Humanos, perros, gatos, monos, guepardos, ratas	Gastritis, síntomas dispépticos, linfoma tipo MALT	Kusters <i>et al.</i> , 2006
Enterohepáticas			
<i>H. hepaticus</i>	Ratón, otros roedores	Proliferación de tiflocolitis, hepatitis, carcinoma hepatocelular	Kusters <i>et al.</i> , 2006
<i>H. bilis</i>	Ratón, perro, humano	Hepatitis	Hannula y Marja-Liisa, 2007
<i>H. fennelliae</i>	Humano	Diarrea y gastroenteritis	Totten <i>et al.</i> , 1985
<i>H. cinaedi</i>	Humano y hamster	Proctitis, colitis, diarrea, gastroenteritis	Hannula y Marja-Liisa, 2007
<i>H. canis</i>	Perro y humano	Hepatitis, diarrea	Hannula y Marja-Liisa, 2007

1.1.4. Modo de transmisión y reservorios

La adquisición de *H. pylori* es desconocida, la bacteria tiene una estrecha gama de hospederos y se encuentra casi exclusivamente en el ser humano y algunos primates no humanos. Algunos estudios han propuesto que la adquisición de *H. pylori* se produce a través de una fuente ambiental común, en particular los animales y el agua han sido implicados como posibles fuentes de infección (Mitchell, 2001). En algunas ocasiones ha sido aislada de animales domésticos por lo que se ha considerado que la presencia de estos puede ser un factor de riesgo para la infección por *H. pylori* (Morris *et al.*, 2001; Morris *et al.*, 2002; Dore *et al.*, 2004; Herbarth *et al.*, 2001). También se ha observado por PCR que las heces de las moscas caseras contienen a la bacteria, por lo que estos insectos además de ser reservorios, pueden ser vectores importantes para la transmisión (Argyros *et al.*, 2000).

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

- **Vía gastro-oral:** Debido a la presencia de *H. pylori* en el jugo gástrico en un 58% de pacientes, se plantea la posibilidad de que el reflujo del jugo gástrico represente el vehículo de transmisión de esta bacteria (Varoli *et al.*, 1991). La posibilidad de que esta ruta sea importante en niños se debe a que las secreciones del estómago o vómitos y regurgitación de material gástrico son muy comunes en la infancia (Mitchell *et al.*, 1989; Mitchell *et al.*, 1992; Axon, 1995).

- **Vía oral-oral:** Los intentos de cultivar *H. pylori* a partir de la cavidad oral no han sido muy efectivos. Sin embargo, hay un número limitado de estudios donde se ha identificado por PCR esta bacteria a partir de la placa dental y de la saliva (Cellini *et al.*, 1995; Ferguson *et al.*, 1993; Kraiden *et al.*, 1989).

Datos epidemiológicos referentes a algunos hábitos culturales, como la premasticación de los alimentos (Albenque *et al.*, 1990) y el uso de palillos para comer sugieren factible esta vía en la transmisión de *H. pylori* (Chow *et al.*, 1995).

- **Vía fecal-oral:** Existen algunas pruebas que apoyan el paso de *H. pylori* a través del intestino (Dye *et al.*, 1990). Sin embargo se sabe que esta bacteria no está bien adaptada para sobrevivir a través de este, incluso hay reportes que demuestran que *H. pylori* es sensible a los efectos letales de la bilis (Mitchell *et al.*, 1992; Raedsch *et al.*, 1989).

Independientemente de la vía de transmisión, está demostrado que la infección se da principalmente en el entorno familiar; al parecer es la madre quién infecta al hijo en sus primeros años de vida y esto ocurre con más frecuencia en los países en desarrollo (Malaty *et al.*, 2000).

1.1.5. Epidemiología: prevalencia y distribución geográfica

Se ha reportado que *H. pylori* ha infectado el estómago humano por años y muy probable desde los inicios de la existencia del hombre actual (Linz *et al.*, 2007). También se ha descrito la presencia de antígenos de *H. pylori* en la materia fecal de humanos momificados y se ha demostrado que la bacteria ha prevalecido por más de 3000 años de antigüedad (Allison *et al.*, 1999).

La prevalencia de *H. pylori* muestra gran variación geográfica. En el caso de los países en desarrollo, más del 80% de la población tiene infección por *H. pylori*, presentándose a edad temprana (Pérez-Pérez *et al.*, 2004), mientras que éste valor en países industrializados es alrededor del 40% y es considerablemente menor en niños y adolescentes que en adultos y personas mayores (Pounder y Ng, 1995; Mitchel, 2001). La prevalencia de *H. pylori* se correlaciona con el nivel socioeconómico, principalmente con las condiciones de vida durante la infancia, higiene y saneamiento (Malaty y Graham, 1994).

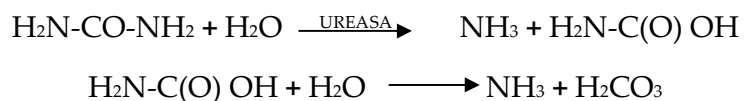
En el caso de México y de acuerdo con la encuesta nacional que utilizó serología como método de escrutinio en población abierta mostró una frecuencia global de 66%. Los resultados positivos se incrementaron en proporción directa a la edad y fue mayor de 80% en personas de 26 años o más (Torres *et al.*,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

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

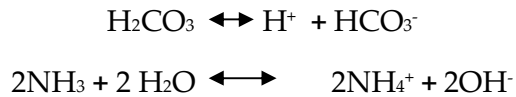
1.1.6. Factores de virulencia

La capacidad de *H. pylori* para sobrevivir en un ambiente tan hostil como el gástrico es atribuida al desarrollo de características especializadas que le permiten un alto nivel de adaptación. Son varios los factores de virulencia de *H. pylori* involucrados en la colonización (Fig. 3), daño al tejido y sobrevivencia. Los factores esenciales para **colonizar** la mucosa gástrica son:

a) La actividad de la **ureasa**. Esta enzima se encuentra tanto en el citosol de la bacteria como en su superficie y cataliza la hidrólisis de urea para proporcionar amonio y carbamato, que a su vez se descompone para producir amonio y ácido carbónico:



En soluciones acuosas, el ácido carbónico liberado y las dos moléculas de amonio están en equilibrio con sus formas ionizadas. El efecto neto de esta reacción causa un incremento de pH (Mobley, 2001).



b) Normalmente *H. pylori* tiene de 2 a 6 **flagelos** unipolares que le permiten avanzar en su nicho ecológico, representado por la capa de la mucosa del epitelio gástrico. Cada flagelo muestra una típica estructura similar a una bombilla en su extremo distal conocida como vaina, que es una extensión de la membrana externa y se cree que esta estructura protege del ataque del ácido del estómago (Geis *et al.*, 1993).

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

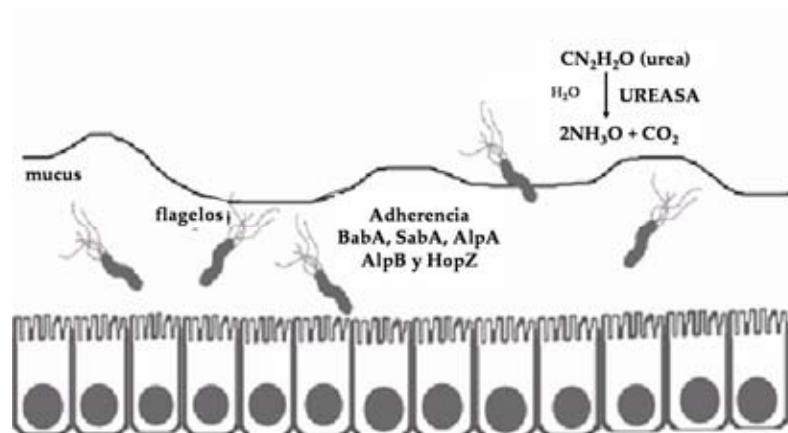


Fig. 3. Factores de **colonización** de la bacteria *H. pylori*. La ureasa contribuye en la resistencia al medio ácido, los flagelos permiten la movilidad y la penetración a la mucosa gástrica y algunas proteínas como BabA, SabA, AlpA, AlpB y HopZ, permiten la adhesión de la bacteria a las células epiteliales. (Tomado de Holly *et al.*, 2006).

Entre los factores involucrados en la inflamación y **daño al epitelio** encontramos la proteína asociada a la vacuolización de las células epiteliales (**VacA**), la cual es más frecuente en pacientes con úlcera péptica que en pacientes con gastritis antral. Los mecanismos de acción propuestos son: 1) formación de grandes vacuolas en el citoplasma de células epiteliales que se originan a nivel perinuclear y terminan llenando el citosol; 2) aumento en la permeabilidad de las células polarizadas aumentando la salida de nutrientes, 3) inducción de la formación de canales a través de la bicapa lipídica (Morales-Espinoza, 2000; Ogura *et al.*, 2000).

El gen asociado a la citotoxicidad *cagA*, codifica para una proteína de membrana externa **CagA**. Su función aun no es bien conocida pero se sabe que induce la formación de grandes vacuolas citoplásmicas en células epiteliales *in vitro* y es capaz de inducir apoptosis.

En la **inflamación** están involucrados los lipopolisacáridos, que juegan un papel importante en la respuesta inmune, vía CD4 leucocítica. Las fosfolipasas hidrolizan a los fosfolípidos de las membranas celulares liberando lisolectina, la cual constituye un factor ulcerogénico. Los tetrapéptidos bacterianos ejercen un importante efecto quimiotáctico sobre eosinófilos y neutrófilos, lo cual facilita su reclutamiento y proliferación (Hansen *et al.*, 1999). Estas células al activarse inducen la liberación de citocinas y mediadores inflamatorios (como los metabolitos del ácido araquidónico, radicales libres y factores activadores de plaquetas) provocando una respuesta inflamatoria, que lesiona la mucosa.

Como factores de **sobrevivencia**, la bacteria posee un superóxido dismutasa y una catalasa que previene la fagocitosis (Hazell *et al.*, 1991; Spilgelhalder *et al.*, 1993), las cuales se han encontrado tanto en la forma cocoide como en la de bacilo.

1.1.7. Enfermedades asociadas a *H. pylori*

La colonización por *H. pylori* no implica la presencia de una sintomatología en el hospedero, pero si un riesgo de desarrollar alguna enfermedad. Se estima que los pacientes *H. pylori*-positivos tienen un 10 a 20% de riesgo de desarrollar úlceras y entre 1 al 3% de riesgo de desarrollar cáncer gástrico distal (Ernst y Gold, 2000; Kuipers *et al.*, 1995; Kuipers, 1999). El desarrollo, tipo y gravedad de los trastornos gastrointestinales ante la presencia de *H. pylori* depende principalmente de las características de la cepa bacteriana y del hospedero, y de factores ambientales. Las principales enfermedades asociadas a *H. pylori* son: gastritis aguda, gastritis crónica, gastritis crónica atrófica (úlceras pépticas), metaplasia intestinal, displasia epitelial gástrica, cáncer gástrico y linfoma gástrico tipo MALT.

Gastritis aguda

Incluye procesos inflamatorios en la mucosa y submucosa. Cuando se ingiere *H. pylori*, esta penetra a través de la capa mucosa del estómago y se multiplica en proximidad cercana a las células epiteliales superficiales (Dixon, 2001). Primero coloniza el antro (Fig. 4), debido a que no existen células parietales que secreten ácido (Gur *et al.*, 1999; Innocenti *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1995). En esta fase inicial aguda de la infección existe una intensa proliferación bacteriana e inflamación gástrica que es disparada por componentes de la membrana externa de la bacteria como los lipopolisacáridos que inducen la producción de las citocinas IL-8 y GRO α las cuales promueven el influjo continuo de neutrófilos a la mucosa gástrica infectada (Innocenti *et al.*, 2001). Durante este período se desarrolla hipoclorhidria, así como una disminución de ácido ascórbico en el jugo gástrico.

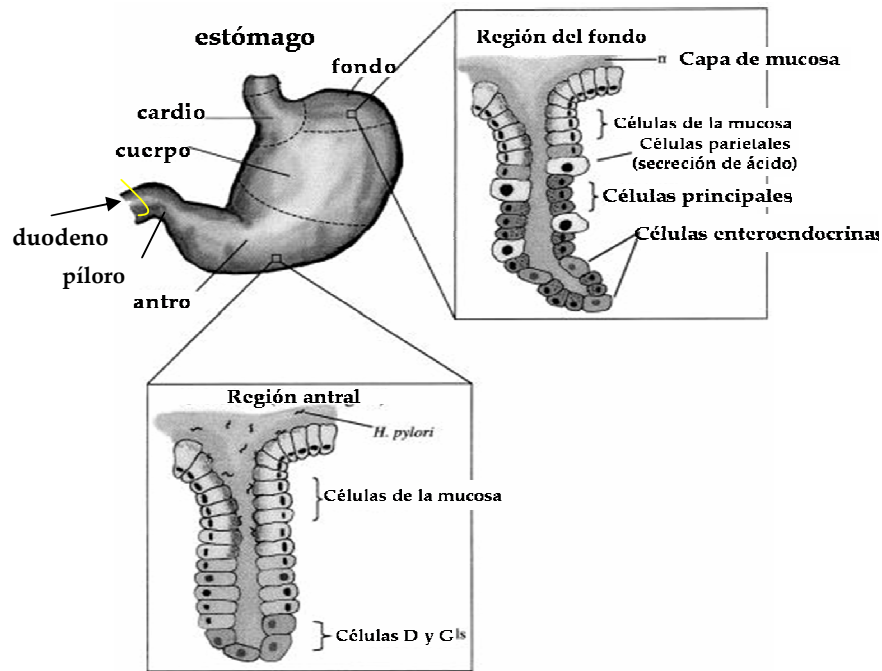


Fig. 4. Representación esquemática de la estructura gástrica. El estómago se divide en cinco regiones: cardio, fondo, cuerpo, antro y píloro. El epitelio gástrico está recubierto por una capa protectora de moco secretado por células epiteliales especializadas. Las faveolas contienen varios tipos de células, incluyendo las células secretoras de moco. La colonización por *H. pylori* se limita en gran medida al antro, que carece de secreción de ácido por las células parietales (Tomado de Testerman *et al.*, 2001).

Gastritis crónica

Se caracteriza por el arribo de linfocitos y células plasmáticas a la mucosa en respuesta a la alta producción de citocinas. La proliferación de células B y su subsiguiente diferenciación en células plasmáticas producen la síntesis de IgM y anticuerpos que amplifican la reacción inflamatoria. Debido a que persiste la infección por *H. pylori* se da una segunda fase de defensa de las células B, las cuales se presentan en forma de folículos linfoides con la producción de células plasmáticas y la síntesis de IgA. Si continúa la infección entonces se pasa a un nivel de daño mayor (Dixon, 2001).

Gastritis crónica atrófica

Consiste en la alteración de la estructura y pérdida del tejido glandular, esto provoca que se deje de producir moco y sustancias elementales para mantener la

funcionalidad de la mucosa y se empiezan a formar úlceras. Las úlceras consisten en una rotura de la mucosa que protege al estómago de la acción del ácido y de las enzimas, sobrepasando la submucosa o *muscularis mucosae* y pueden presentarse en la curvatura menor del estómago o en el duodeno, aunque normalmente *H. pylori* no coloniza el duodeno, se estima que del 10-15% de las personas infectadas por la bacteria llegan a desarrollar úlceras duodenales (Logan y Walker, 2001).

Metaplasia intestinal

Las glándulas gástricas son reemplazadas por epitelio de tipo intestinal diferenciado, similar al del intestino delgado normal. Se han descrito dos tipos: metaplasia intestinal completa e incompleta, en esta última la diferenciación del epitelio intestinal no es total. Desde el punto de vista bioquímico se producen enzimas similares a las del intestino delgado como la fosfatasa alcalina, disacáridos, aminopeptidasa y otras (Rothery y Day, 1985).

Displasia epitelial gástrica

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

Aproximadamente 1-3% de pacientes con displasia epitelial desarrollan cáncer gástrico en un tiempo de 5 a 15 años (Rugge *et al.*, 1994).

Cáncer gástrico

Los posibles mecanismos por los que se asocia a *H. pylori* con este padecimiento son dos: el primero corresponde a un efecto carcinogénico de la bacteria y el segundo por el establecimiento de un ambiente carcinógeno producto de una infección prolongada por *H. pylori*, ya que la bacteria puede causar inflamación de la mucosa gástrica, la infección crónica causa atrofia que a su vez puede generar metaplasia intestinal y estos cambios son considerados precursores del cáncer gástrico (Asaka *et al.*, 2001).

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

Linfoma gástrico tipo MALT

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

1.1.9. Terapia de erradicación y resistencia a antibióticos

A partir de que se declara a *H. pylori* como el principal agente causal de la gastritis crónica activa y la úlcera péptica se han planteado varios criterios para su erradicación. En la conferencia de consenso se aceptó que la eliminación de *H. pylori* sólo se debe dar en pacientes con úlcera péptica (gástrica o duodenal) complicada o no; linfoma gástricos MALT; en algunos casos de gastritis crónica activa y en pacientes con antecedentes familiares de cáncer gástrico (Blaser, 1992; 1997; 1998 a, b; 1999 a, b).

Actualmente el tratamiento de erradicación cuenta con el uso de antibióticos (Fig. 5) y de inhibidores de la secreción de ácido en el estómago (antagonistas de los receptores de la histamina o inhibidores de la bomba de protones IBP) [Tabla 2].

Tabla 2. Medicamentos utilizados para el tratamiento de erradicación de *H. pylori*

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

A pesar de que *H. pylori* es sensible a una amplia gama de antibióticos *in vitro*, no lo es *in vivo*. La terapia usada comúnmente es la terapia triple, la cual consiste de un IBP y dos antibióticos (claritromicina y amoxicilina, metronidazol o tinidazol). Sin embargo, se reporta que este tratamiento no es efectivo en un 20% debido a la aparición de cepas resistentes, por lo cual en estos casos se ha empezado a utilizar una terapia cuádruple que consiste de sales de bismuto, tetraciclina, metronidazol o tinidazol y un inhibidor de la bomba de protones.

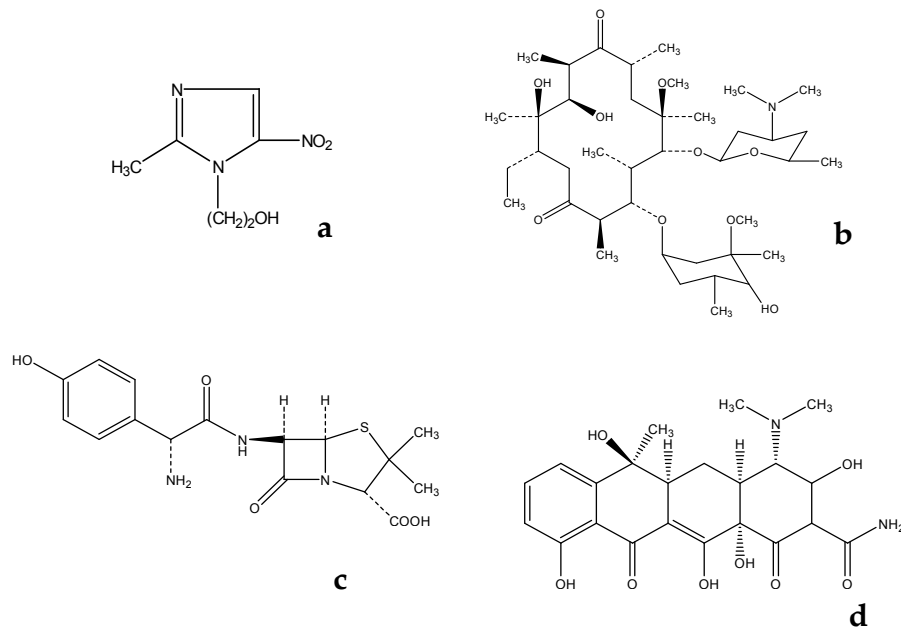


Fig. 5. Antibióticos más utilizados para la erradicación de *H. pylori*: a) Metronidazol; b) claritromicina; c) amoxicilina; d) tetraciclina.

Otro problema muy importante de las terapias son los efectos secundarios perjudiciales. También la resistencia a antibióticos se presenta en pacientes que han tenido un tratamiento previo y que siguen viviendo bajo las mismas condiciones a las que se infectaron. Tomando en cuenta todos los problemas de las terapias actuales surge la necesidad de la búsqueda de nuevos antibióticos y terapias de erradicación (Graham *et al.*, 2008).

1.2. Plantas medicinales y *H. pylori*

Las plantas son la fuente por excelencia de la medicina tradicional mexicana y constituyen un elemento importante para implementar nuevos planes de salud combinando el conocimiento popular con el científico (Argueta *et al.*, 1994).

La acción preventiva o curativa de las plantas medicinales se debe a sustancias que provocan un efecto fisiológico en el organismo, estos son conocidos como “principios activos” y generalmente son producto del metabolismo secundario de las plantas. Estos metabolitos secundarios tienen una distribución

restringida en las plantas, a veces, a sólo una especie o un grupo de ellas (Gros *et al.*, 1985). Algunos de ellos actúan como antibióticos o antisépticos, otros como sedantes o analgésicos, otros operan como estimulantes del sistema nervioso o bien, tienen actividad neuromuscular, entre otras funciones.

En México existen cerca de 30,000 especies de plantas y de acuerdo con el reporte etnobotánico de Bye y colaboradores (1991) 3,352 especies de plantas son de uso medicinal.

En cuanto a las plantas medicinales utilizadas en México para la gastritis, úlceras y enfermedades relacionadas con *H. pylori*, a la fecha no se ha determinado el número exacto de ellas, ya que en numerosas comunidades estas palabras se desconocen y el término “dolor de estómago” muchas veces incluye a estas patologías. Sin embargo, para darse una idea de la magnitud de ellas, podemos indicar que el Instituto Nacional Indigenista hasta 1994, catalogó a nivel nacional 1,024 plantas utilizadas en general para padecimientos del aparato digestivo (INI, 1994).

A nivel mundial, la búsqueda de agentes derivados de plantas (extractos crudos, fracciones y compuestos) para el tratamiento de gastritis y úlceras se ha dado, incluso desde antes de que se reconociera a *H. pylori* como el principal agente causal de la gastritis crónica activa y úlcera péptica.

El primer reporte de plantas con un efecto contra *H. pylori* es el de Cassel-Beraud y colaboradores (1991), quienes observaron que de 13 plantas medicinales estudiadas, 5 presentaron una actividad contra la bacteria. A partir de este trabajo se han llevado a cabo múltiples estudios respecto al potencial anti-*H. pylori* de las plantas medicinales y se reporta que a nivel mundial, de un total de 327 plantas, 60.8% de ellas tienen alguna actividad contra la bacteria (Castillo-Juárez y Romero, 2007). Acerca de las plantas medicinales mexicanas, solamente se han realizado dos estudios que evalúan su potencial anti-*H. pylori*; el primero de ellos, realizado por un grupo de investigadores extranjeros y utilizando plantas de la medicina tradicional Maya Yucateca, reportó 3 plantas con dicha actividad (Ankli *et al.*,

2002). El segundo, realizado en nuestro laboratorio, analizó el potencial de 55 plantas medicinales de todo el país, de las cuales el 77% mostró alguna actividad contra la bacteria (Castillo-Juárez *et al.*, 2009). Así pues, considerando la gran diversidad florística del país y que la mayor parte de ellas son plantas endémicas, es importante avocarse a su estudio, tanto para la implementación de nuevas terapias, como para la búsqueda de nuevos antibióticos.

Una de las plantas más utilizadas en México para el tratamiento de gastritis, úlceras y cáncer de estómago, es *Amphipterygium adstringens* (cuachalalate). Esta planta ha sido utilizada desde tiempos prehispánicos y ha formado parte importante de la cultura y de la medicina tradicional, esto ha favorecido que la especie sea una de las más estudiadas y comercializadas. A la corteza del cuachalalate se le han realizado estudios fitoquímicos, farmacológicos y se ha reportado que tiene compuestos con actividad anti-*H. pylori* (Castillo-Juárez *et al.*, 2007).

1.3. Integrantes del “complejo cuachalalate” y/o plantas asociadas.

Linares y Bye (1987) han propuesto el concepto de “complejos” para las plantas medicinales. Este concepto proviene del uso popular de las plantas y se refiere a especies con nombre vulgar común, propiedades curativas similares y/o características morfológicas parecidas; sin embargo, de ellas una es la más importante y preferida por la gente. Ya en la práctica, se ha encontrado que a veces no se cumplen todos los requisitos y se ha observado que, cuando no se consigue alguna de ellas, es sustituida por otra del complejo.

Para el caso de la corteza del cuachalalate, no se han realizados estudios formales acerca de la existencia de un “complejo”. La distribución del cuachalalate es amplia y aparentemente se comercializa la misma planta: el cuachalalate denominado rojo. Realizando una búsqueda de plantas que pertenecieran a un posible “complejo” cuachalalate, nos informaron que en Tepeaca, Puebla existe una planta con el nombre de cuachalalate blanco, *Guaiacum coulteri*, la cual se

utiliza para problemas gastrointestinales (Comunicación personal: Linares y Bye, 2008). Por otro lado, encontramos un reporte de que el cuachalalate se “adultera” comercialmente con la corteza de *Cyrtocarpa procera* [chupandilla] (Rosas *et al.*, 2001).

A continuación se hará una monografía de cada una de estas plantas que podrían conformar un “complejo cuachalalate”.

1.3.1. Cuachalalate rojo

1.3.1.1. Taxonomía

De acuerdo con la base de datos del Jardín Botánico de Missouri (Missouri Botanical Garden (<http://mobot.mobot.org/W3T/Search/vast.html>), la nomenclatura científica del cuachalalate es:

División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Sapindales
Familia	Anacardiaceae
Género	<i>Amphipterygium</i>
Especie	<i>Amphipterygium adstringens</i> (Schltdl.) Standl.
Sinónimos	<i>Juliania adstringens</i> (Schltdl.) Schltdl. (1843). <i>Hypopterygium adstringens</i> Schltdl. (1843).

La familia **Anacardiaceae** es moderadamente grande; comprende unas 600 especies en 74 géneros que se encuentran en zonas tropicales de todo el mundo, aunque también hay representantes en zonas templadas. Una característica típica de esta familia es la presencia de canales resiníferos en la corteza, cuya resina es clara pero al contacto con el aire se ennegrece (Ding, 1978; Judd *et al.*, 2002). Esta familia ha sido relacionada con la familia Julianiaceae debido a la anatomía de la madera y la química de flavonoides. El género *Amphipterygium* ha presentado varios cambios y actualmente agrupa a tres especies: *A. glaucum* Hemsley & Rose, *A. molle* Hemsley y *A. adstringens* Schlechtendal y la subespecie *A. adstringens*

simplicifolium Standl. *A. molle* también es conocida con el nombre común de “cuachalalate” (Cuevas, 2001).

1.3.1.2. Nombres comunes

El vocablo cuachalalate proviene del término náhuatl “cuauchachalatli”. Etimológicamente hablando, este vocablo se compone de *cuáhuatl* que significa árbol y *chachalatli*, nombre que designa a cierto pájaro hablador *Chamepetes unicolor* Salvin, mejor conocido vulgarmente como chachalaca. Cuachalalate significa literalmente: “árbol de la chachalaca” (Cabrera, 1980).

El nombre común es variado y estos nombres son dados principalmente por los habitantes de los pueblos donde habita, por ejemplo, en Michoacán es conocido como “cuachalalate”, “maceran”, “maticerán” (de la lengua tarasca: matixerán) y “pacheco”. También se le conoce como “palo de rosa”, “cuacha”, “chalalote”, “chalalate”, “quetchalalatl” y “cuachalalá” (Álvarez, 1998; Zamudio-Lara, 2005). En otros lugares como el Distrito Federal se le llama “cuachalalatl” (nombre náhuatl); en Guerrero se conoce como “macerán”; en Oaxaca se le da el nombre de “cuachinala” (INI, 1994) y “yala-guitu” (lengua zapoteca) en la región del istmo; en Jalisco “mapiceran”; en Morelos “muaxalaxtlitli” (lengua azteca) y en Puebla “volador” (Martínez, 1987).

1.3.1.3 Descripción

El cuachalalate es un árbol dioico, que mide entre 5 y 10 m de altura, tronco generalmente torcido, de corteza lisa con grandes escamas engrosadas y suberificadas (Estrada, 1985) color moreno grisáceo o gris plomizo y con pocas ramas, la corteza interna tiene una coloración que va de crema rosado a rosado rojizo (Fig. 6). La corteza es muy astringente y tiene un olor picante. El grosor de ambas cortezas varía de 10 a 20 mm (Zamora-Tirado, 2003).



Fig. 6. Características de *A. adstringens*: a) árbol de cuachalalate en los meses de sequía; b) fruto del cuachalalate (Herbario Nacional del Instituto de Biología MEXU); c) tronco del cuachalalate, cuya característica sobresaliente en la Familia Anacardiaceae es su corteza resinosa; d) muestra para realizar las pruebas (procedente de Tepeaca, Puebla).

Las hojas están dispuestas en espiral aglomeradas en las puntas de las ramas en grupos de 3-5 y miden de 3-6 cm incluyendo el pecíolo, el haz del foliolo es de color verde opaco y en el envés es color verde grisáceo. El fruto consiste en nueces alargadas, abultadas, aladas de 2.5 a 5 cm de largo y de color verde pálido (Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, 2001; Ortiz, 2004; Rojas, 2001).

1.3.1.4. Distribución

En general, el género es de origen americano y se distribuye desde México hasta el Perú (Heywood, 1978; Stevens *et al.*, 2001). Se distribuye en la vertiente del pacífico desde Nayarit hasta Chiapas, incluyendo la cuenca del río Balsas. El árbol *A. adstringens* es una especie nativa de México y se puede encontrar en los estados de Guerrero, Morelos, Michoacán, México, Nayarit, Jalisco, Zacatecas, Puebla, Chiapas, Oaxaca, Guatemala (Fig. 7) y Costa Rica (Grayum *et al.*, 2008), entre los 100 a 300 msn (INI, 1994). Habita en climas cálidos, semicálidos y templados, con

una temperatura media anual de 24.1°C, con lluvias de verano y una estación seca muy marcada de octubre a mayo. Es una especie dominante de selvas bajas caducifolias, asociada generalmente con diversas especies de *Bursera* y *Pseudosmodingum perniciosum* Engl. (Pennington y Sarukhán 1998; Rzedowski, 1978), *Backebergia*, *Lysiloma* y *Cyrtocarpa procera* Kunth (Rosas *et al.*, 2001). También se reporta su presencia en bosque tropical subcaducifolio, matorral xerófilo, bosque espinoso, mesófilo de montaña y pino-encino (INI, 1994). Crece en zonas perturbadas y progresa muy bien en zonas sujetas a incendios periódicos (Pennington y Sarukhán, 1998).



Fig. 7. Distribución de *Amphipterygium adstringens* en la República Mexicana.

1.3.1.5. Uso etnobotánico

La importancia biológica y económica del cuachalalate radica en el uso medicinal, principalmente la corteza, la cual se expende en los mercados nacionales. Se conocen cerca de 40 usos terapéuticos tradicionales del cuachalalate, principalmente para el tratamiento de úlceras gástricas, cáncer de estómago, gastritis pesadez estomacal (Olivera *et al.*, 1999), algunas lesiones cutáneas y también tiene efecto astringente. Se utiliza para afecciones femeninas como la

infección vaginal, fiebre puerperal, el flujo vaginal anormal, la inflamación y la caída de matriz y de ovarios.

La corteza también se usa para infecciones bucales como estomatitis herpética y aftosa; dolor de muelas y para endurecer las encías. Hay referencias de su uso en enfermedades del hígado y de la vesícula; para el tratamiento de tifoidea; padecimientos respiratorios como la tos, resfriado, tuberculosis y enfermedades pulmonares; calmante, antibiótico, disolución de cálculos biliares; agente hipocolesterolemiante, antiinflamatorio, para rozaduras de bebés, golpes, mordeduras o piquetes de animales venenosos, cicatrizante para inflamación e infección renales; fiebre intermitente, paludismo, caída de cabello, manchas en la piel, gangrena y la diabetes son padecimientos que también se han tratado con la corteza (Hersch-Martínez, 1995; Argueta *et al.*, 1994; Olivera *et al.*, 1999)

Por otro lado, debido a la calidad de su madera se ha reportado que no tiene uso comercial en productos maderables (Pennington y Sarukhán, 1998). La SEMARNAT la sitúa como una especie con uso no maderable (<http://www.conafor.gob.mx/portal/docs/secciones/reforestacion/Fichas%20Tecnicas/Amphipterygium%20adstringens.pdf>). También se ha reportado su uso comestible, ya que el pedúnculo alado del fruto se puede consumir.

La planta se comercializa en mercados locales o regionales. El principal abastecedor es el mercado de Sonora en el D. F., sin embargo, la planta se recolecta en las áreas de distribución natural de la especie como son el estado de Morelos, la mixteca poblana y parte de la cuenca del Balsas, las cuales se ven fuertemente afectadas por el descortezamiento tradicional, ya que se llega a destruir los tejidos vitales y se causa la muerte de por lo menos el 30% de los árboles aprovechados, mientras que el resto vive en condiciones adversas, en las cuales es muy difícil un segundo aprovechamiento (Solares y Gálvez, 2001). Actualmente el aprovechamiento del cuachalalate se encuentra regulado por la norma NOM-059-ECOL-2001.

Para el uso sustentable de esta especie, se recomienda que la corteza del árbol no supere los 8 o 10 mm. El corte debe ser homogéneo sin descortezar hasta el nivel de la madera, porque además de dañar seriamente la fisiología del árbol, su regeneración es deficiente y probablemente no se pueda descortezar nuevamente. Por ningún motivo se debe descortezar árboles menores de 10 años de edad o que tengan 15 cm o menos de diámetro. Para mejorar la calidad de corteza regenerada, es necesario que cuando se descortece, se cubra esta zona con plástico blanco. Con este sencillo procedimiento se reduce la deshidratación, el agrietamiento y se obtiene una corteza de buena textura y con calidad necesaria para su uso tradicional o farmacéutico. Para conservación de la corteza, es recomendable secarla a la luz del sol o en cuartos de secado ya que este tipo de corteza tiene un porcentaje de agua de más de 50% (Inifap, 2002).

1.3.1.6. Modo de empleo

El modo de empleo varía de acuerdo a la zona geográfica, al tipo de padecimiento y la parte utilizada de la planta, por ejemplo:

- Para la gastritis y úlceras gástricas se utilizan 50 gr de corteza para medio litro de agua y se toma como agua de uso (Rojas, 1986).
- Para la úlcera gástrica, se prepara la corteza junto con árnica en infusión, antes de cada alimento (Baytelman y Avilés, 1981).
- El preparado para la gastritis consiste en agregar corteza de cuachalalate, de encino y cancerina en cocimiento y se toma una taza de té tres veces al día (Rojas, 1986).
- El cocimiento de la corteza se aplica en forma de lavados vaginales cuando se presentan infecciones, caída de la matriz o de ovarios. En algunos casos se endulza como en padecimientos respiratorios, tos, “inflamación de las anginas”, resfriados, tuberculosis y enfermedades pulmonares.
- Para heridas, como uso interno se toma el cocimiento de la corteza tres veces al día, para el uso externo, se lavan las heridas con la infusión

(Baytelman y Avilés, 1981; INI, 1994), o se aplica el polvo formado por la pulverización de la corteza directamente sobre la herida.

- Para los pulmones: se hierve una "cáscara", calculando solamente que pinte el agua, se toma como agua de uso; o bien, se agrega la "cáscara" de cuachalalate hasta que hierve el agua. También se toma para la tos (Ortiz, 1988).
- Para los riñones, la corteza del cuachalalate y el palo de tres costillas en té (una tacita) se toma diariamente (Baytelman y Avilés, 1981).
- La tintura: se utiliza como sustituto del "mertiolate"; para lo cual se realiza una extracción con alcohol al 96%, dejándose reposar por tres días para posteriormente filtrarlo (Magdaleno, 1987).

No se conocen reportes de intoxicaciones humanas graves por su uso terapéutico tradicional (Rojas, 2001).

1.3.1.7. Compuestos aislados

El efecto terapéutico se le atribuye principalmente a la corteza de cuachalalate (INI, 1994). Se han reportado en la corteza la presencia de triterpenos tetracíclicos y pentacíclicos, así como ácidos y aldehídos anacárdicos (Navarrete, 1986; Mata *et al.*, 1991). Los compuestos mayoritarios son los triterpenos y los fenoles de cadena larga. En la Fig. 8 se representan los compuestos mayoritarios del cuachalalate.

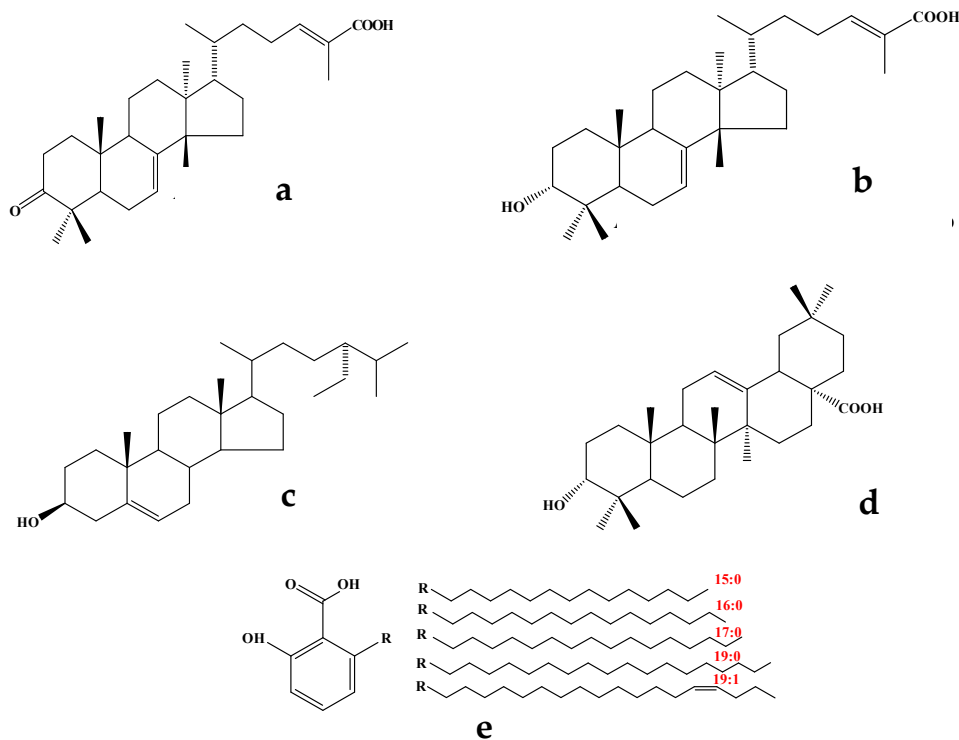


Fig. 8. Estructuras de los compuestos mayoritarios de *A. adstringens* (cuachalalate rojo): a) ácido masticadienónico, b) ácido 3 α -hidroximasticadienónico, c) β -sitosterol, d) ácido 3-epioleanónico, e) ácidos anacárdicos (Tomado y modificado de González y Delgado, 1962; Navarrete *et al.*, 1982; Soriano-García *et al.*, 1987; Navarrete *et al.*, 1986; Navarrete *et al.*, 1989; Soriano-García *et al.*, 1987; Mata *et al.*, 1991).

1.3.1.8. Actividad biológica y efectos sinérgicos

De la corteza se han aislado compuestos de naturaleza terpética a los cuales se les ha demostrado sus propiedades gastroprotectora, antiinflamatoria y anti-*H. pylori*, aunque también se ha observado que en ocasiones el extracto crudo presenta mayor actividad que los compuestos puros, por lo que es posible que exista un efecto sinérgico entre ellos. Las actividades biológicas comprobadas experimentalmente para la corteza son la antitumoral, antiulcerogástrico, antiinflamatorio, antimicrobiano, antifúngico y cicatrizante:

Antitumoral

El extracto metanólico de la corteza del cuachalalate demostró tener una actividad antitumoral del 54% en ratones con adenocarcinoma mamario, mientras que el extracto acuoso presentó una actividad antitumoral del 48%. La capacidad de daño al tumor de la droga ha sido asociada principalmente con las fracciones que contienen saponinas. Sin embargo, al probar las saponinas aisladas se encontró que estas presentan menor actividad que un extracto completo, lo que nos indica un efecto sinérgico con otros compuestos (González *et al.*, 1962).

Antiulcerogástrico

Un extracto obtenido del cocimiento de la corteza y un extracto de acetato de etilo, mostraron en ratas un efecto protector, ya que las muestras inhibían la secreción de jugo gástrico y además contribuyeron a la rápida cicatrización del epitelio y de la mucosa gástrica (Arrieta *et al.*, 2003). En ratas Wistar con úlceras gástricas inducidas por la administración de etanol absoluto, se demostró que con el extracto metanólico de la corteza tiene una actividad protectora del 74.5% a una dosis de 300 mg/kg. De la fracción triterpénica de este extracto se demostró actividad gastroprotectora del 95% (Navarrete *et al.*, 1998) y se aislaron e identificaron los siguientes compuestos activos: β -sitosterol (Fig. 8d) con una actividad gastroprotectora del 75.3% a una dosis de 3 mg/kg; ácido masticadienónico (Fig. 8a) con una actividad del 59.1% a dosis de 1.0 mg/kg; 3- α -hidroximasticadienónico (Fig. 8b) presenta una actividad del 77.5% a dosis de 3 mg/kg y; el ácido 3-epioleanólico (Fig. 8f) con una actividad del 65.4% a dosis de 0.1 mg/kg, siendo este último el que presenta la mayor actividad de los compuestos identificados (Benitez-Yañez, 1998).

Antinflamatorio

Esta actividad se le atribuye al terpeno α -hidroximasticadienónico que presentó una actividad del 93% en la inhibición del edema en ratones, después de tres horas de haberse administrado el tratamiento en una dosis de 10 mg/kg (Olivera *et al.*, 1999). El extracto hexánico también presentó una actividad antiinflamatoria del 49.1% (dosis dependiente) en ratas Wistar con edema en la oreja que fue inducida por TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato). En ratas Wistar con edema inducida por carragenina, se demostró que el extracto acuoso de la corteza tiene un efecto inhibitorio del 82.6% con una dosis de 100 mg/kg (Oviedo-Chávez *et al.*, 2004). El 3-a-hidroximasticadienónico y el ácido masticadienónico, han sido reportados con con efecto citóxico contra células de leucemia (Makino *et al.*, 2004).

Antimicrobiano

Del ácido masticadienónico se ha reportado actividad contra *Micobacterium tuberculosis* (Rivero-Cruz *et al.*, 2005).

Por otra parte, la mezcla de ácidos anacárdicos (Fig. 8c) tiene una potente actividad anti-*H. pylori* (dosis-dependiente) con una concentración mínima inhibitoria de 10 μ g/ml y el ácido 3-epioleanólico presenta una inhibición del 70% con 50 μ g/ml (Castillo-Juárez *et al.*, 2007).

Antifúngico

Con preparados de la corteza molida, se ha encontrado efecto inhibitorio en la formación del micelio y la esporulación del hongo *Fusarium moniliforme* (Bravo *et al.*, 2000).

Cicatrizante

En un estudio en ratas Wistar se uso un extracto metanólico a las dosis de 3, 10, 30 y 100 mg y se midió el porcentaje de cicatrización de heridas y del contenido de colágeno de las lesiones cutáneas producidas en las ratas. Los resultados

mostraron que no hubo aumento en la velocidad de cicatrización, pero si se detectó mejor epitelización y remodelación de la cicatriz (Resenos, 2003).

1.3.2. Cuachalalate blanco

1.3.2.1. Taxonomía

De acuerdo con la base de datos del Jardín Botánico de Missouri (<http://www.tropicos.org/NameSpecimens.aspx?nameid=34600182>) el cuachalalate blanco esta reconocido dentro de la familia Zygophyllaceae. Aunque se han aplicado varios sinónimos de *Guaiacum*, la denominación aceptada para esta especie es:

División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Sapindales
Familia	Zigophyllaceae
Género	<i>Guaiacum</i> L.
Especie	<i>Guaiacum coulteri</i> A. Gray

Sinónimos *Guaiacum palmeri* Vail (1910)

Guaiacum parvifolium Planch ex A. Gray (1852)

Guaiacum planchonii A. Gray ex Vail y Ridberg (1887)

1.3.2.2. Nombres comunes

Se le da el nombre vulgar de “cuachalalate blanco” en Puebla (Linares y Bye, 2008: comunicación personal), “guayacán” o “cen”, “guayacán real”, “guayacán genuino” o “guayacán verdadero”, “guayacán amarillo”, “huaxacán”, “guayaco”, “árbol santo”, “palo santo” (IMEPLAM, 1978; Soto, 1987), en Oaxaca se conoce también como “hueycán”, “matlaquahuitl”, “soon”, “yaga-na” (Pennington y Sarukán, 1998), “yaga-gupi”, “yutnu-tandaa”, “mot-zi”, “chumchintoc”.

1.3.2.3. Descripción

Gray lo describió como un arbusto o árbol de 1 a 12 m de altura, portador de 3 a 5 pares de folíolos lineares oblongos, puntiagudo con bases desiguales. El fruto es de forma de una cápsula con 5 celdillas regulares. Su ambiente más favorable es en exposición al sol o con alguna sombra en bosques o arbustos secos. Sus flores son de color azul-violeta intenso y brotan principalmente en abril y septiembre (Gray, 1897).

La corteza es color verde grisáceo, la textura de la corteza externa es escamosa con fondo liso y de la corteza interna es granulosa y escamosa (Fig. 9). Sin olor, con sabor ligeramente amargo, presenta crecimiento irregular, madera muy dura, fuerte y durable (Centeno-Betanzos, 2007).



Fig. 9. a) Árbol de *Guaiacum coulteri* A. Gray (Zygophyllaceae); b) fruto del árbol; c) flor azul-violeta; d) muestra con la que se prepararon los extractos.

El hábitat natural de *G. coulteri* en México se ha reducido y por lo tanto también su uso por la escasez resultante de la sobreexplotación, desaparición de las selvas, deforestación con fines agrícolas y por la introducción de especies no nativas como *Pennisetum ciliare*, *G. coulteri* tiene lento crecimiento y la competencia con especies arbóreas de más rápido crecimiento constituye una amenaza natural

para sus poblaciones (Pennington y Sarukán, 1998), a pesar de esto, sigue siendo utilizada para adornar jardines de casas, pero debido a que se encuentra bajo protección especial, su uso y aprovechamiento está sujeto a la normatividad federal sobre vida silvestre, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana 059-2001.

1.3.2.4. Distribución

Tiene una distribución en la pendiente del pacífico y el noreste de México. Se encuentra en los estados de Baja California Sur, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Sinaloa, Sonora, y en Guatemala [<http://www.tropicos.org/NameSpecimens.aspx?nameid=34600182>] (Fig. 10).



Fig. 10. Distribución de *Guaiacum coulteri* A. Gray en la República Mexicana.

1.3.2.5. Uso etnobotánico

En la literatura podemos encontrar que a diferentes partes de *G. coulteri* como la madera, la corteza, la resina, las hojas y las flores, se les atribuyen propiedades medicinales. Entre ellas, se reporta el uso para padecimientos respiratorios, como anticancerígeno, para la tos de tuberculosis, como astringente

y para la diabetes (Ramos *et al*, 1992a, b). En los mercados se vende para purificar la sangre, se utiliza también como estimulante y diaforético, depurativo, expectorante y laxante. El jarabe hecho a base de las flores combinadas con otras plantas se utiliza para despertar el apetito y quitar ascos del embarazo, también se usa para el parto, úlceras gástricas, digestivo y tumores (Soto, 1987). El aceite se utiliza para los dientes cariados, enfermedades venéreas, la resina como sudorífica; el agua del tronco se utiliza para el dolor de estómago, como diurético, desinflamante de riñón, hígado, cólicos hepáticos, pulmones, enfermedades cutáneas, llagas de la espundia; el raspado de la madera sirve para el asma, gota coral, vejiga, riñones; el fruto y las flores para la disentería, sífilis, reumatismo, tuberculosis, fiebre (López e Hinojosa, 1988).

Por las características de dureza y resistencia de la madera, se ha utilizado intensamente para la fabricación de ejes de ruedas de carretas y piezas sujetas a constante fricción y para hacer durmientes.

1.3.2.6. Modo de empleo

- El preparado consiste en agregar cuachalalate rojo, cuachalalate blanco, árnica y cancerina, se hierve y se toma. Este preparado es para "tonificar y engrosar el tejido intestinal" en Tepeaca, Puebla (Linares y Bye, 2008: Comunicación personal).
- Para la diabetes, el riñón, como diurético y para purificar la sangre se hierven 3 trozos de la planta en 1 l de agua. El té se toma durante todo el día.
- Para la garganta y para aliviar los bronquios en un preparado con otras plantas se hierven 5 trozos de corteza en 1 litro de agua, se hierve y se toma en el día (Centeno-Betanzos, 2007).

1.3.2.7. Efecto biológico

De acuerdo al uso popular dado a *G. coulteri*, se demostró su actividad hipoglucemiante en conejos, por lo que se considera como una especie con efectos antidiabéticos (Ramos *et al.*, 1992b). Al evaluar los mecanismos de la actividad hipoglucemiante encontrada se observó el requerimiento de la función del páncreas o la presencia de insulina para que *G. coulteri* presentara su efecto (Ramos *et al.*, 1992a), por lo que aún se requiere de futuras investigaciones que respalden su uso en humanos para el control de la diabetes.

En las hojas y tallos se ha detectado la presencia de alcaloides (INI, 1994).

1.3.3. **Chupandilla**

1.3.3.1. Taxonomía

De acuerdo con la base de datos del Jardín Botánico de Missouri (Missouri Botanical Garden (<http://www.tropicos.org/Name/40020581>), el nombre científico de la chupandilla corresponde a:

División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Sapindales
Familia	Anacardiaceae
Género	<i>Cyrtocarpa</i>
Especie	<i>Cyrtocarpa procera</i> Kunth
Sinonimos	<i>Dasycarya mexicana</i> Liebm. <i>Tapiria purpussi</i> T. S. Brandeg

1.3.3.2. Nombres comunes

La corteza de *Cyrtocarpa procera* Kunth es conocida comúnmente como “chupandilla” o “coco de cerro”. En el estado de Morelos se conoce como “chucumpun”. Su nombre en cora es “puei” (INI, 2004), pero también se conoce con otros nombres como “copal”, “copalcojote”, “tepalcojote”, “chocote”, “popoacua”, “maxocote”, “kopayocotl” (náhuatl, “ciruelo benaco”), en Guerrero

se conoce como “berraco”. En Michoacán “chucumpuz” y en Nayarit como “chocote”.

1.3.3.3 Descripción



Fig. 11. Árbol de *C. procera*, foto tomada en Higuierón, Morelos rumbo a Nexpa (2008).

Es un árbol que llega a medir entre 5 y 7 m de alto, su tronco robusto con corteza es de color grisáceo (Fig. 11). Las flores tienen pétalos blancos y pueden medir 6 cm de largo, brotan por abril y mayo. Los frutos se producen posteriormente y maduran entre agosto y septiembre, son globosos cubiertos de pelos de 2 a 2.5 cm de largo con una semilla sumamente dura.

El mesocarpio es bastante jugoso y de color amarillo cuando esta maduro. Las hojas compuestas tienen un parecido a las plumas, son oblongas, dispuestas en espiral de 4 a 7 cm [Fig. 12] (Cabrera *et al.*, 1998).



Fig. 12. *Cyrtocarpa procera* Kunth (Chupandilla): a) Floración en el mes de Abril (Higuierón, Morelos); b) Hoja de herbario de la chupandilla (Herbario Nacional de la UNAM); c) Foliolos y frutos secos (Herbario Nacional, UNAM); d) Corteza de la chupandilla, colecta de Higuierón.

1.3.3.4. Distribución

C. procera Kunth es un árbol que habita en bosque tropical caducifolio y se encuentra ampliamente distribuido en los estados de Colima, Durango, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca y Puebla [http://www.tropicos.org/NameSpecimens.aspx?nameid=50145943] (Fig. 13). Crecen en zonas de tierra caliente entre los 1200 y 1500 m de altitud, en la vegetación de bosque tropical caducifolio. Frecuentemente se encuentran en zonas donde abundan *Bursera* spp (copales) y *Ipomoea arborecens* (los casahuates); *Acacia* spp. (cubateras); *Acacia farnesiana* (huizacheras) y en las barrancas (Cabrera *et al*, 1998).



Fig. 13. Distribución de *Cyrtocarpa procera* Kunth en la República Mexicana.

1.3.3.5. Uso etnobotánico

En los estados de Morelos y México, la corteza de *C. procera* es conocida por su uso medicinal y se utiliza para tratamiento de disentería, diarrea, enfermedades de la piel y dolor. Para la tos e inflamación se prepara en

infusión. También se utiliza para aliviar el dolor de cintura (Monrroy-Ortiz y Castillo, 2000; Rodríguez-López *et al.*, 2003).

En San Rafael Coxcatlán, Puebla se hizo un análisis cuantitativo del conocimiento tradicional en plantas medicinales y se reporta que la corteza de *Cyrtocarpa procera*, conocida como chupandilla, se utiliza para dolor de riñón (Canales *et al.*, 2005).

El área de aprovechamiento es la Mixteca Poblana-oaxaqueña. De la semilla se extrae la almendra o “coco” que es comestible pero a grandes cantidades puede causar diarrea o malestares estomacales. Para el ganado se aprovecha como forraje, las hojas son utilizadas como base para pescar y empacar quesos o frutos silvestres. La madera se utiliza para construcción (Chávez-Servia *et al.*, 2004). Otros usos reportados para la chupandilla son el artesanal, el comestible, como forrajera y como sustituto del jabón por la presencia de saponinas (Benitez-Yañez, 1998; Rosas *et al.*, 2001).

1.3.3.6. Modo de empleo:

- En algunos lugares se cuecen 3 trozos de 10 cm de la planta en 1l de agua y la beben como agua de tiempo.
- En San Rafael Coxcatlán, Puebla se prepara un té con la corteza de la chupandilla combinada con biznaga y el cuachalala, y se toma como agua de tiempo (Canales *et al.*, 2005).
- Preparada en cocimiento junto con *A. adstringens* (cuachalalate) se emplea para lavar heridas y llagas y lograr una cicatrización más rápida; administrada por vía oral, se usa para quitar el dolor de cintura en Nayarit.

1.3.3.7. Compuestos aislados

De la corteza de *Cyrtocarpa procera* se ha aislado e identificado β -amirina (Rosas *et al.*, 2001), β -sitosterol y una mezcla de ácidos grasos, entre otros compuestos (Fig. 14).

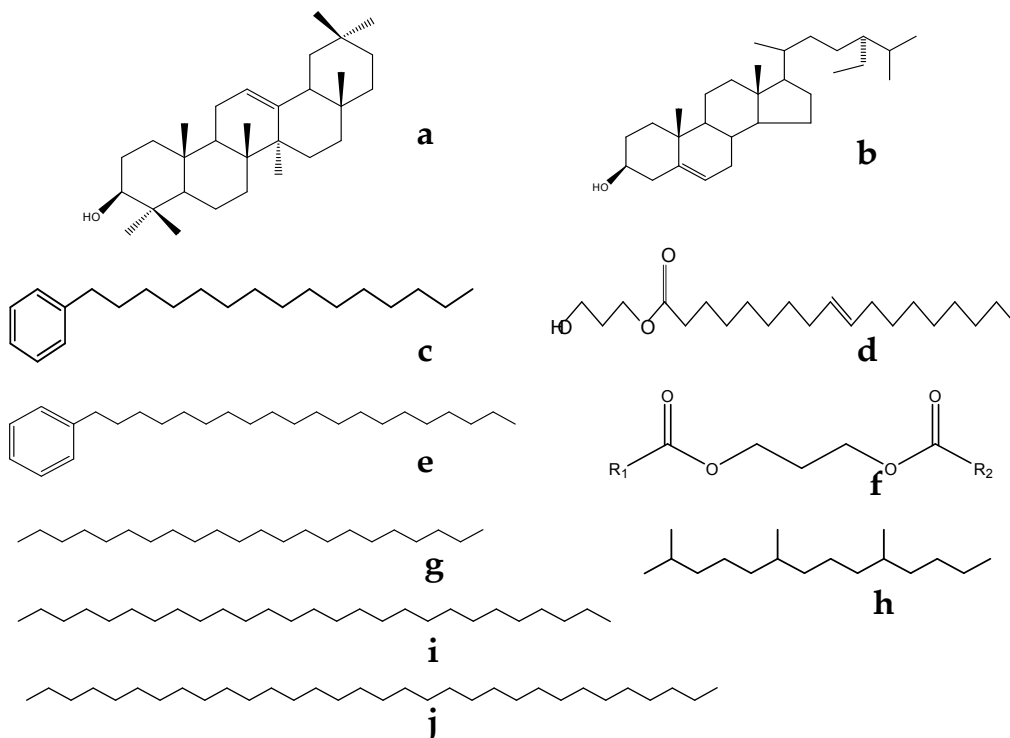


Fig. 14. Compuestos aislados de *C. procera*: a) β -amirina; b) β -sitosterol; c) pentadecilbenzeno; d) 3-hidroxipropil-9-octadecenoato; e) mezcla de eicosilbenzeno; f) 1, 3-propil-dipentadecanoato; g) docosano; h) 2, 6, 10-trimetil-teradecano; i) heptacosano; j) dotriacontano. (Tomado de Rodríguez-López *et al.*, 2006).

CAPÍTULO 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 Justificación

La infección por *H. pylori* puede conducir a una gran variedad de trastornos tales como gastritis aguda y crónica, úlcera péptica, linfoma tipo MALT y cáncer gástrico. Se calcula que el 50% de la población mundial esta colonizada por esta bacteria, pero en países en desarrollo, como es el caso de México, la frecuencia global es del 66% (Torres *et al.*, 2005).

La presencia de *H. pylori* puede ser diagnosticada por una variedad de estudios y ser tratada con antibióticos ya conocidos. Actualmente, la erradicación de esta bacteria se recomienda únicamente en pacientes que presentan úlcera péptica y/o linfoma gástricos tipo MALT y en algunos casos de gastritis crónica activa (Blaser, 1992; 1997; 1998a y b; 1999a y b), desafortunadamente las terapias y antibióticos que se utilizan para el tratamiento de las enfermedades causadas por esta bacteria no son efectivas en un 20% de los casos, esto es debido principalmente a que las bacterias han venido desarrollando resistencia a los antibióticos ya existentes, también porque estas terapias producen efectos secundarios que perjudican el organismo o bien, porque no se termina el tratamiento de estas.

Por otro lado, estudios a nivel mundial, han demostrado el efecto de extractos de plantas sobre *H. pylori*, sin embargo, a pesar de que México es un país muy rico en vegetación, se han hecho pocos estudios farmacológicos a plantas mexicanas y en especial acerca de su potencial anti-*H. pylori*.

Como se ha mencionado, una de las plantas más utilizadas para el tratamiento de gastritis, úlcera gástrica y cáncer gástrico es *A. adstringes* (cuachalalate rojo). De esta planta se han aislado e identificado compuestos triterpénicos como el ácido 3 α -hidroximasticadienónico, ácido 3-epioleanólico y el β -sitosterol, de los cuales se han realizado estudios farmacológicos que demuestran actividades gastroprotectoras y antiinflamatorias; y más

recientemente se ha demostrado la actividad anti-*H. pylori* de algunos de sus componentes: los ácidos anacárdicos. Todo esto perfila a esta planta como un candidato para el desarrollo de un tratamiento integral de las enfermedades producidas por *H. pylori*.

El cuachalalate se utiliza para muchas afecciones además de las ya indicadas, lo que hace que esta planta tenga una demanda impresionante, es en este punto donde cobra importancia el concepto de los “complejos”. Los complejos están constituidos por especies de plantas que comparten un nombre común y a los que la gente les atribuye propiedades curativas similares. La comercialización indistinta de las plantas que comprenden los complejos contribuye para evitar el agotamiento de las plantas más solicitadas. Sin embargo no hay un control de calidad de los mismos.

A la fecha no existe algún trabajo formal acerca de un “complejo cuachalalate”, sin embargo, existen dos plantas que podrían ser parte del mismo: en primer lugar, *G. coulteri* (cuachalalate blanco) que además de tener prácticamente el mismo nombre común, se le han atribuido propiedades curativas parecidas; en segundo lugar, *C. procera* (chupandilla), con la cual se dice que se “adultera” la corteza del cuachalalate, principalmente por su parecido morfológico. Además, la chupandilla pertenece a la misma Familia del cuachalalate y considerando que los compuestos activos se restringen a un grupo de plantas o una especie, se pensó que era factible buscar los compuestos activos (ácidos anacárdicos) en ella.

Tomando en consideración lo anterior, en este trabajo el objetivo fue estudiar la actividad anti-*H. pylori* de estas dos plantas.

2.2. Objetivo general:

Analizar la actividad anti-*Helicobacter pylori* de las cortezas de *Guaiacum coulteri* A. Gray (Cuachalalate blanco) y *Cyrtoarpa procera* Kunth (Chupandilla).

2.2.1. Objetivos particulares

- Determinación de la actividad anti-*H.pylori in vitro* de los extractos acuosos y metanólicos de estas dos plantas.
- Análisis comparativo, por cromatografía en capa fina, de los compuestos presentes en estas dos plantas y los compuestos activos de *Amphipterygium adstringens* (cuachalalate rojo).
 - Análisis comparativo de los compuestos presentes en cuachalalates de diferentes localidades.
- Fraccionamiento preliminar de los extractos hexánicos del cuachalalate blanco y de la chupandilla por cromatografía en columna y cromatografía en capa fina.
 - Determinación de la actividad anti-*H. pylori in vitro* de los grupos de compuestos aislados.

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Obtención del material biológico

Las cortezas de *Amphipterygium adstringens* (cuachalalate rojo) y *Guaiacum coulteri* A. Gray (cuachalalate blanco) procedentes de Tepeaca, Puebla, fueron proporcionados e identificados por la M. en C. Edelmira Linares y el Dr. Robert A. Bye del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM; la corteza de *Cyrtocarpa procera* Kunth (chupandilla) fue colectada en Juárez, Morelos a 7 km de Higuierón, rumbo a Nexpa, en abril del 2008 e identificada por la M. en C. Rosa María Fonseca. Estas tres cortezas fueron las utilizadas para el desarrollo de la Tesis y en la Tabla 3 se presentan los No. de Colecta, No. de MEXU que las identifican y su procedencia. En la misma tabla, se muestran los mismos datos de identificación de las cortezas del cuachalalate rojo procedentes de diferentes localidades y que se utilizaron para el análisis comparativo de compuestos activos.

Tabla 3. Especies botánicas utilizadas. Identificación y procedencia.

No. Colecta	No. de Colección Etnobotánica MEXU	Nombre científico y común	Procedencia
Bye y Linares 35251	(--)	<i>Amphipterygium adstringens</i>	Tepeaca, Puebla.
Bye y Linares 35250	2042	<i>Guaiacum coulteri</i>	Tepeaca, Puebla.
Fonseca 3729	(--)	<i>Cyrtocarpa procera</i>	Higuierón, Morelos.
Linares y Bye 1490	1490	<i>A. adstringens</i>	Axochiapa, Morelos.
Linares y Bye 1491	1491	<i>A. adstringens</i>	Jolalpan, Puebla.
(--)	(--)	<i>A. adstringens</i>	Rancho campeón
Bye y Linares 34907	2044	<i>A. adstringens</i>	Zacatecas.
G. Martínez 1	2045	<i>A. adstringens</i>	Zacatecas.
E. Linares 1988 y R. Bye	(--)	<i>A. adstringens</i>	Agua Caliente, Zacatecas. (corteza y corcho)

(--) muestras en proceso de depósito a la colección Etnobotánica de MEXU.

3.2. Crecimiento de *H. pylori*

Para realizar este trabajo se utilizó la cepa ATCC 43504 de *H. pylori*, que se conserva en colección a -80°C. Las bacterias se cultivaron en cajas agar-sangre-vancomicina. Posteriormente se introducen en una incubadora Nuaire TS autoflow (mod. 3500) ajustada a 37°C con 10% de CO₂ y 5% O₂. El CO₂ que se inyecta a la incubadora es de una pureza estándar (INFRA). Después de 24 hrs de incubación en la atmósfera microaerofílica descrita, el cultivo se observa como un tapete translúcido, el cual es colectado en medio de cosecha y se guarda a -80°C hasta su utilización. Los **medios de cultivo** utilizados para el crecimiento, cosecha y pruebas de actividad anti- *H. pylori* fueron:

- **Placas para cultivo:** se resuspenden 42 g/l de agar Casman en agua destilada. Se esteriliza a 121°C por 20 min en la autoclave (Irayama H-M-II), se deja enfriar y se agrega vancomicina 10 mg/l y sangre de carnero al 5 %.
- **Medio de Cosecha:** se resuspende 28 g/l de caldo de Brucella (DIFCO) en agua bidestilada, se le agrega glicerol al 10% y se esteriliza a 121°C durante 20 min, se deja enfriar y se agrega 10% de suero fetal bovino estéril (Gibco BRL) y vancomicina 10 mg/l.
- **Placas para cuenta viable o determinación de las unidades formadoras de colonias (UFC):** se resuspenden 42 g/l de agar Casman en agua destilada y β -ciclodextrina al 2%. Se esteriliza a 121°C por 20 min, se deja enfriar y se agrega vancomicina 10 mg/l.
- **Medio Caldo Mueller-Hinton (Para la prueba anti-*H. pylori* de extractos metanólicos):** se resuspenden 21 g/l de medio Mueller Hinton

Broth (DIFCO) en agua destilada y β -ciclodextrina al 2%. Se esteriliza a 121 °C por 20 min, se deja enfriar y se agrega vancomicina 10 mg/l.

- **Placas para la prueba anti-*H. pylori* de extractos acuosos:** la primera parte corresponde a preparar los extractos a las diferentes concentraciones: 0 (control con agua), 125, 250, 500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$. En un tubo falcon se disuelve en 10 ml de agua bidestilada los extractos liofilizados correspondientes a cada concentración: 10, 20, 40 y 80 μg , respectivamente. Para preparar las cajas se utilizaron 3.04 g de agar Mueller-Hinton, los cuales se agregaron en frascos de vidrio con una barra magnética para agitar y 66 ml de agua bidestilada para cada frasco. Se esterilizaron a 121°C durante 20 min. Una vez estéril los medios se dejaron enfriar y se agregó a cada frasco 4 ml de sangre de carnero (5% final), los 10 ml del extracto de la planta previamente disueltos y los antibióticos. Los antibióticos utilizados fueron 4: anfotericina 2 mg/l (evita el crecimiento de hongos); polimixina 2.5 mg/l (evita el crecimiento de *Pseudomonas*); trimetropina 5 mg/l (evita el crecimiento de otras bacterias Gram negativas); vancomicina 10 mg/l (evita el crecimiento de bacterias Gram positivas). Las concentraciones de los extractos se hicieron por triplicado. Finalmente para quitar el exceso de humedad, las cajas se dejaron en una estufa a 37°C durante 24 horas.

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

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

3.2.1. Pruebas de identificación de *H. pylori*

- **Ureasa rápida:** se requiere una solución de urea 6 M a pH 7.0 y 0.05 % de rojo de fenol (color canela). La prueba consiste en detectar la actividad de la enzima ureasa. En un tubo se agregan 0.3 ml de solución y al añadir

una asada de bacterias se observa el viraje de la solución a un color rosa-rojo que indica la alcalinización del medio (Fig. 15a).

- **Catalasa:** en un portaobjetos se ponen unas gotas de peróxido de hidrógeno al 40% y se les adiciona con el asa de siembra una pequeña cantidad de cultivo. La prueba es positiva si hay producción de burbujas (O₂) (Fig. 15b).
- **Oxidasa:** en un cuadro de una placa de Dry Slide Oxidase (DIFCO) se coloca un poco de cultivo. Si la bacteria es oxidasa positiva, se observa una coloración azul intenso en unos cuantos segundos (Fig. 15c).

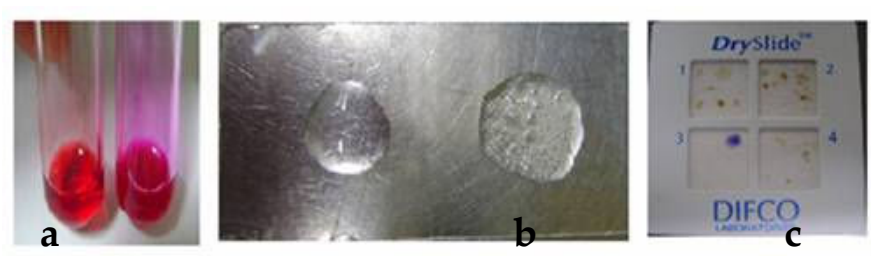


Fig. 15. Pruebas de identificación de *H. pylori*: a) ureasa, b) catalasa y c) oxidasa

- **Tinción Gram:** a partir de un cultivo se toma una asada de bacterias y se extiende en un portaobjetos con una gota de agua o solución salina. Se realiza la tinción de Gram estándar. Si la bacteria se tiñe de color rojizo por la safranina, quiere decir que la bacteria es *Gram-negativa*. La morfología se verifica, observando las formas típicas de la bacteria: forma de bacilo en cultivos frescos y en cultivos viejos es evidente la forma cocoide.

3.3. Obtención de los extractos

3.3.1. Extracto acuoso (EA)

Se utilizaron 50 g de la planta (en este caso, corteza de cuachalalate rojo, de chupandilla y cuachalalate blanco). Mediante decocción con 400 ml de agua corriente, durante 10 min, se obtuvo el extracto acuoso. Una vez que esta a

temperatura ambiente, el extracto se filtra con papel Whatman No. 1; posteriormente, la muestra se congela en un matraz Kitasato de 1 l a -70°C en el REVCO para ser liofilizado (Liofilizador Labconco). El residuo se pesa para obtener el rendimiento.

3.3.2. Extracto metanólico (EM)

Se utilizaron 50 g de la planta para ser macerados en 150 ml de metanol durante 3 días. Posteriormente el sobrenadante obtenido se filtra en papel Whatman No. 1, se evapora en un evaporador rotatorio a 50°C y el residuo se vacía en frascos de vidrio, dejándolos destapados para que se evapore totalmente el metanol. Se pesa el restante para determinar el rendimiento. Para la realización de los ensayos de inhibición se preparan diluciones concentradas de los extractos en DMSO.

3.3.3. Extracto hexánico (EH)

Se tomaron entre 120 a 150 g de muestra de la planta para macerarlos con hexano durante 3 días. Posteriormente el sobrenadante se filtra con papel Whatman No. 1, se evapora en un evaporador rotatorio a 37°C y el residuo se vacía en frascos para lograr la evaporación completa. Este extracto se utilizó para la separación de los compuestos por cromatografía en columna.

3.4. Actividad anti-*H. pylori* in vitro de los extractos (acuoso y metanólico)

Para realizar las pruebas de los **extractos acuosos** se utilizó el método de dilución en agar, el cual es un método de referencia aprobado por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés) para determinar la susceptibilidad de compuestos contra *H. pylori*. Las concentraciones finales de los extractos en las placas fueron: 0 (control), 125, 250, 500 y 1000 µg/ml. En el caso de la chupandilla se probaron también las concentraciones de 62.5 y 31.25 µg/ml con el objeto de determinar correctamente

su actividad, ya que con las primeras concentraciones siempre obtuvimos el 100% de inhibición.

El cultivo se preparó colocando la cepa ATCC 43504 de *H. pylori* de un vial con aprox. 0.20 mg de bacterias en un tubo con medio (Caldo Mueller-Hinton- β -ciclodextrina-vancomicina) hasta alcanzar una $A_{660} = 0.1$ (determinado en una dilución 1:10). Las bacterias así diluidas se siembran en las cajas previamente preparadas que contienen los extractos acuosos de las plantas. Se incuban durante 5 días y se determina la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

Al momento de la siembra, se realiza una cuenta viable del cultivo para determinar el número de bacterias utilizadas, valor que debe ser de 1×10^8 UFC. Cada concentración se determina por triplicado.

En cuanto a los **extractos metanólicos**, se midió la actividad anti-*H. pylori* en las concentraciones finales siguientes: 0 (control), 31.25, 62.5, 125, 250 y 500 $\mu\text{g/ml}$. Pero en el caso del cuachalalate rojo y cuachalalate blanco se bajaron las concentraciones hasta 3.95 $\mu\text{g/ml}$, para poder determinar la CMI. Para obtener la CMI se coloca un cultivo ajustado a una $A_{660} = 0.2$, en la incubadora con una agitación de 150 rpm hasta que alcanza una $A_{660} = 0.3$ (que representa el inicio de la fase logarítmica de crecimiento y equivale a 10×10^7 UFC determinado por cuenta viable). A continuación se vacían 3 ml de cultivo en tubos estériles con tapa y se les añade 20 μl de las diferentes concentraciones a ensayar de cada uno de los extractos o 20 μl de DMSO en el caso de los controles. Cada concentración de extracto metanólico se hace por triplicado y por quintuplicado para los controles.

La CMI se obtiene calculando primero el cambio de la absorbencia (ΔA) de cada cultivo tanto de los controles como de los experimentales:

$$\Delta A = A_f - A_i$$

A_f = absorbencia del cultivo final

A_i = absorbencia del cultivo inicial

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

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

Con éste porcentaje de crecimiento bacteriano se obtiene el porcentaje de inhibición (%I) del extracto metanólico y de los antibióticos de referencia (amoxicilina y metronidazol).

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

Con el %I se obtiene la CMI, la cual se define como la concentración mínima a la cual se obtiene el 100% de inhibición en el crecimiento del cultivo bacteriano.

3.5. Métodos de separación

Una vez obtenidos los extractos y probada su actividad, se procedió a un proceso de separación para analizar los componentes de los extractos metanólico y hexánico. Se utilizaron dos técnicas cromatográficas: cromatografía en capa fina (CCF) y cromatografía en columna (CC).

En la primera parte del análisis se hizo una CCF para separar los compuestos de los extractos metanólico y hexánico de las plantas asociadas al cuachalalate rojo: la chupandilla y el cuachalalate blanco, para determinar si en alguna de ellas se encontraba presente alguno de los compuestos de referencia. Posteriormente, se hizo otra CCF para identificar si los compuestos de referencia de *A. adstringens* (cuachalalate) estaban presentes en plantas que se consiguieron de diferentes estados de la República con la denominación de "cuachalalate" (rojo).

Los compuestos de referencia del cuachalalate rojo utilizados fueron: 3-epioleanólico; β -sitosterol; ácido masticadienónico; ácido 3 α -hidroximasticadienónico y ácidos anacárdicos. Estos fueron proporcionados por

el grupo de la Dra. Rachael Mata, quienes realizaron los estudios de caracterización química.

Para este trabajo se utilizaron como fase estacionaria cromatofolios AL TLC 20 X 20 cm Silica gel 60 F₂₅₄. Las muestras se aplicaron en forma de línea en el cromatofolio con ayuda de capilares. Una vez aplicadas las muestras en el cromatofolio se corrió en hexano-acetato de etilo (7:3) [fase móvil] en un tanque cromatográfico. La detección de compuestos se hizo con luz ultravioleta a 254 y 365 nm y con un revelador: vainillina 5M (vainillina + H₂SO₄). Los compuestos revelados en la CCF ya sea con luz UV o con vainillina pueden aparecer, dependiendo de su naturaleza, en forma de “bandas o manchas”. Una vez observados y determinados los compuestos que estaban presentes en los extractos metanólicos y hexánicos, se prosiguió a la separación por CC, para probar la actividad anti-*H. pylori* por grupos de compuestos.

Columna de gel de sílice

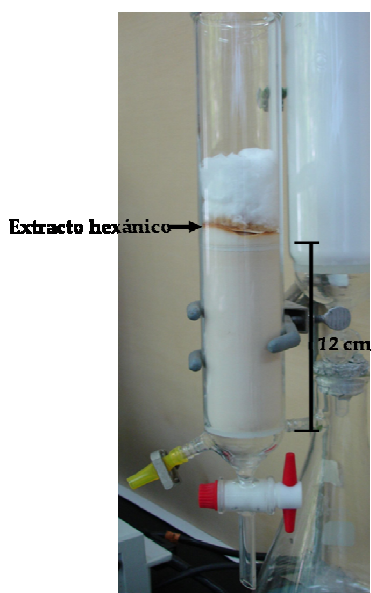


Fig. 16. Cromatografía en columna

CC del extracto hexánico de la corteza del cuachalalate blanco. En una columna (22 X 5 cm) se empacó con 100 g de gel de sílice (Merck, grado 60, malla 70-230). La muestra preabsorbida del EH de cuachalalate blanco (2.4 g) se cargó en la columna como se ve en la Fig. 16. Primero se eluyó con hexano y conforme se obtenía cada fracción se fueron monitoreando los compuestos eluidos por CCF y se juntaron las fracciones de composición similar. La polaridad del solvente se fue aumentando de acuerdo a la obtención de los compuestos aislados.

Los gradientes de polaridad fueron:

- Hexano
- Hexano-cloroformo (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:5, 3:7, 2:8 y 1:9)
- Cloroformo

- Cloroformo-acetato de etilo (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:5, 3:7, 2:8 y 1:9)
- Acetato de etilo
- Acetato de etilo-metanol (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:5, 3:7, 2:8 y 1:9)
- Metanol

CC del extracto hexánico de la corteza de la chupandilla. En este caso de la chupandilla, la columna cromatográfica (12 X 3.5 cm) se empacó con 50 g de gel de sílice (Merck, grado 60, malla 70-230) y la muestra preabsorbida fue de 1.09 g, a diferencia de la anterior se hizo una “columna flash”, la cual nos permitió hacer la separación a mayor velocidad y obtener las fracciones con los compuestos mayoritarios.

Los gradientes de polaridad fueron:

- Hexano
- Hexano-cloroformo (9:1, 8:2, 6:4, 5:5, 4:5, 2:8 y 1:9)
- Cloroformo
- Cloroformo-acetato de etilo (9:1, 8:2, 6:4, 5:5, 4:5, 2:8 y 1:9)
- Acetato de etilo
- Acetato de etilo-metanol (9:1, 8:2, 6:4, 5:5, 4:5, 2:8 y 1:9))
- Metanol

A partir de las fracciones (*fr*) obtenidas de cada una de las dos columnas, se separaron los compuestos con el método de “raspado de placas cromatográficas”, para probar su actividad *anti-H. pylori*.

3.5.1. Método de “raspado de placas cromatográficas”

A partir de las fracciones obtenidas por CC (24 del cuachalalate blanco y 14 de la chupandilla) se realizaron CCF para separar grupos de compuestos y probar su actividad *anti-H pylori*. Las fracciones se cargaron en cromatofolios AL TLC 20 X 20 cm Sílica gel 60 F₂₅₄ por cuadruplicado y se corrieron con hexano-acetato de etilo 7/3 bajo las mismas condiciones (inclinación, tiempo y lugar). Una de las placas se observó con luz UV a 254 y 365 nm y se reveló con vainillina, se localizaron los grupos de compuestos los cuales podían estar constituidos por uno o más de estos y se denominaron con letras, de la A-T para el cuachalalate blanco

y de la a-q para la chupandilla. Utilizando la placa revelada se localizaron los mismos grupos en las otras 3 placas cromatográficas y se procedió a su extracción de la siguiente manera: se raspó la sílica de las 3 placas correspondiente a cada uno de los grupos y se vació en un tubo de ensaye con 3 ml de acetato de etilo, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min en una centrifuga clínica. El sobrenadante se recuperó en un tubo y se evaporó a temperatura ambiente. El residuo obtenido para cada grupo se resuspendió en 65 μ l de DMSO y se conservó a 40°C hasta su utilización.

Para determinar la sensibilidad del “método de raspado en placa” se realizaron algunos ensayos con muestras de referencia, los cuales se detallan en el Anexo 1.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

4.1. Rendimiento de los extractos acuosos y metanólicos

En la Tabla 4 se muestran los rendimientos obtenidos de los extractos acuosos (EAs) y metanólicos (EMs). En el caso del EA del cuachalalate rojo (cuacha-R) se obtuvo menor rendimiento que del EM, mientras que del cuachalalate blanco (cuacha-B) se obtuvo mayor rendimiento del EA que del EM. Hay que hacer notar que ambos extractos de la chupandilla, superan los rendimientos obtenidos con las otras dos plantas, principalmente el EA (11.3%).

Tabla 4. Rendimiento de los extractos acuosos y metanólicos.

Muestra de planta	Rendimiento (%)	
	Extracto acuoso	Extracto metanólico
<i>Amphipterygium adstringens</i> cuachalalate rojo, Tepeaca, Puebla	1.76	5.71
<i>Cyrtocarpa procera</i> chupandilla, Higuierón, Morelos.	11.3	5.85
<i>Guaiacum coulteri</i> cuachalalate blanco, Tepeaca, Puebla	2.07	1.87

Los EMs de las tres plantas (cuacha-R, cuacha-B y chupandilla) son de un color rojizo y tienen consistencia pegajosa. Los EAs de cuacha-R y la chupandilla tienen un color rojizo, mientras que el de cuacha-B tiene un color café-rojizo (Fig. 17).



Figura 17. Extractos acuosos y metanólicos del cuacha-R y de las plantas asociadas

4.2. Actividad anti-*H. pylori* in vitro de los extractos acuosos y metanólicos

El efecto de los EAs sobre el crecimiento de *H. pylori* se determinó por el método de dilución en agar en las condiciones indicadas en la metodología. En las Tabla 5 se presentan los resultados obtenidos para la actividad anti-*H. pylori* de los EAs de cada planta. En el caso del cuacha-R y la chupandilla, si hubo actividad inhibitoria, mientras que el EA del cuacha-B no tuvo efecto sobre el crecimiento a las concentraciones probadas. La CMI del EA del cuacha-R es de 500 µg/ml, la de la chupandilla es de 62.5 µg/ml y del cuacha-B su CMI es >1000 µg/ml. El efecto inhibitorio que se observa del EA de la chupandilla sobre *H. pylori*, indica que existen compuestos activos en el extracto acuoso, por lo que sería interesante estudiar de que tipo son y que papel juegan en el tratamiento de enfermedades causadas por la bacteria.

Tabla 5. Efecto sobre el crecimiento de *H. pylori* de los extractos acuosos.

No. de colecta	Nombre científico	Concentracion (µg/ml)					
		1000	500	250	125	62.5	31.25
Bye y Linares 35251	<i>Amphipterygium adstringens</i> (cuachalalate rojo)	I	I	NI	NI	ND	ND
Bye y Linares 35250	<i>Guaiacum coulteri</i> (cuachalalate blanco)	NI	NI	NI	NI	ND	ND
Fonseca 3729	<i>Cyrtocarpa procera</i> (chupandilla)	I	I	I	I	I	NI

I = inhibición

NI = no inhibición

ND = no determinado

La actividad anti-*H. pylori* de los EMs se determinó por el método de cultivo líquido como se describió en la metodología. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6. Como se puede apreciar, el EM de la chupandilla no inhibió el crecimiento de *H. pylori*. Los EMs del cuacha-R y del cuacha-B presentaron una actividad significativa, sus CMI están en 7.9 y <3.95 µg/ml respectivamente. En el

caso del cuacha-R no se pudo determinar la inhibición en una concentración de 500 µg/ml, ya que había mucha turbidez en la prueba.

Tabla 6. Porcentaje de inhibición de los extractos metanólicos sobre *H. pylori*.

No. de colecta	Nombre científico	Concentracion (µg/ml)							
		500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.9	3.95
Bye y Linares 35251	<i>Amphipterygium adstringens</i> (cuachalalate rojo)	ND	123	105	103	101	103	100	63
Bye y Linares 35250	<i>Guaiacum coulteri</i> (cuachalalate blanco)	100	123	98	97	100	100	100	100
Fonseca 3729	<i>Cyrtocarpa procera</i> (chupandilla)	88	77	69	71	5	ND	ND	ND

ND = no determinado

La Tabla 7 compendia los valores de CMI obtenidos con las tres plantas para los dos tipos de extractos y se presenta las CMIs de los antibióticos de referencia amoxicilina y metronidazol, obtenidos en cada uno de los métodos empleados para la determinación.

Tabla 7. CMI de los extractos acuosos y metanólicos probados.

No. de Colecta	Nombre científico	Extracto acuoso µg/ml	Extracto metanólico µg/ml
Bye y Linares 35251	<i>Amphipterygium adstringens</i> (cuachalalate rojo)	500	7.9
Bye y Linares 35250	<i>Guaiacum coulteri</i> (cuachalalate blanco)	>1000	<3.95
Fonseca 3729	<i>Cyrtocarpa procera</i> (chupandilla)	62.5	> 500
Antibióticos de Referencia			
Amoxicilina		0.05	0.1
Metronidazol		75	300

4.3. Análisis comparativo de los extractos acuosos, metanólicos y hexánicos de las plantas estudiadas.

Para comparar los compuestos activos del cuacha-R (*A. adstringens*) con las otras plantas con las que se asocia, se realizó una CCF. En primer lugar se corrió una placa cromatográfica de los extractos acuosos y metanólicos, con sus respectivos compuestos de referencia. La Fig. 18 muestra que no es posible detectar los compuestos del extracto acuoso en este tipo de CCF, además en el caso del EM de la chupandilla se registran muy pocos compuestos, por lo cual el siguiente paso fue hacer otra placa cromatográfica con los extractos metanólicos y hexánicos (Fig. 19)

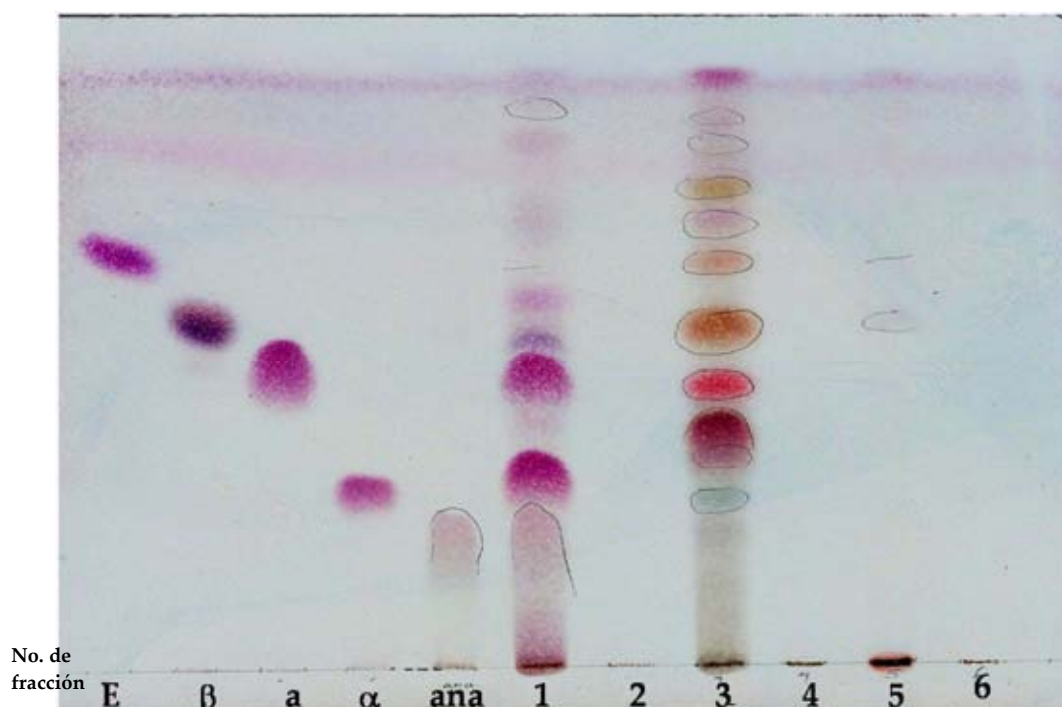


Fig. 18. Cromatografía en capa fina de los extractos acuosos y metanólicos de las plantas estudiadas. Se corrió con hexano-acetato de etilo (7/3) y se reveló con vainillina. Compuestos de referencia: **E** = ácido 3-epioleanólico; **β** = β-sitosterol; **a** = ácido masticadienónico; **α** = 3α- ácido hidroximasticadienónico; **ana** = ácidos anacárdicos. Extractos de las plantas estudiadas: **1, 3 y 5**) EMs del cuacha-R, cuacha-B y chupandilla, respectivamente; **2, 4 y 6**) EAs del cuacha-R, cuacha-B y chupandilla, respectivamente. NOTA. Debido a la poca disponibilidad que se tenía inicialmente del material biológico, el EM de chupandilla que se muestra, proviene de una corteza que ya había sido previamente extraída con hexano, lo que afecta la concentración de los compuestos obtenidos.

En ambas placas se puede observar que los compuestos de referencia no están presentes en las dos plantas asociadas al cuacha-R, aunque el β -sitosterol sí se registra en la chupandilla (indicado en el recuadro).

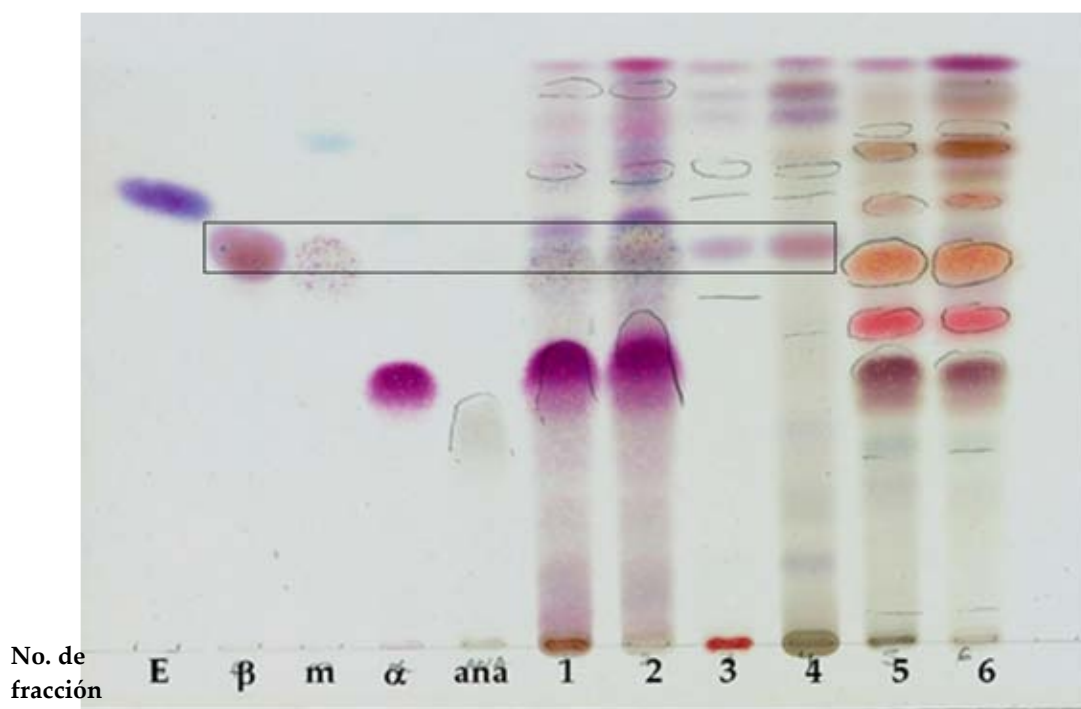


Fig. 19. Cromatografía en capa fina de los extractos metanólicos y hexánicos de las plantas estudiadas. Se corrió con hexano-acetato de etilo (7/3) y se reveló con vainillina. Compuestos de referencia: E = ácido 3-epioleanólico; β = β -sitosterol; a = ácido masticadienónico; α = 3 α - ácido hidroximasticadienónico; ana = ácidos anacárdicos. Extractos de las plantas estudiadas 1, 3 y 5) EMs del cuacha-R, chupandilla y cuacha-B, respectivamente; 2, 4 y 6) EHs del cuacha-R, chupandilla y cuacha-B, respectivamente.

4.4. Análisis comparativo de los extractos hexánicos de cuachalalates procedentes de diferentes localidades.

A la fecha no existe un estudio que evalúe la calidad de los cuachalalates que se ofrecen en el mercado, por tal razón se realizó un análisis por CCF de 7 diferentes muestras de cuachalalates con diferente procedencia, con el objetivo de determinar si todos ellos contenían un patrón similar de compuestos.

En la literatura se reportan varios principios activos de esta planta y uno de ellos ya está registrado en la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. Las muestras de referencia que se consideraron fueron el ácido 3-

epioleanólico, el β -sitosterol, ácido masticadienónico, ácido 3α -hidroximasticadienónico, y ácidos anacárdicos. Para este experimento se utilizaron extractos hexánicos, ya que con este solvente se favorece la extracción de los compuestos que estamos analizando.

En la Fig. 20 se observan los resultados obtenidos. En los carriles 7 y 8 se cargaron extractos de cuachalalate procedente de Agua Caliente, Zac., con la diferencia de que el carril 7 representa la corteza y el carril 8 el corcho. Los compuestos activos de referencia que están presentes en las cortezas de cuachalalates se indican con flechas. En la placa cromatográfica el ácido 3-epioleanólico aparece como una "banda" de color morada (\rightarrow) y está presente en casi todos los cuachalalates, aunque en el caso de los extractos 7 y 8 no es clara su presencia de este. El β -sitosterol, es una banda más oscura (\rightarrow) que la anterior y también se observa que esta presente en casi todos los extractos, en el No. 8 no es muy clara su presencia, posiblemente por que se encuentra en menor cantidad en el corcho del árbol. Los ácidos masticadienónico (\rightarrow) y el 3α -hidroximasticadienónico (\rightarrow) están presentes en todos los cuachalalates. Los ácidos anacárdicos (\rightarrow) que se observan como manchas en forma de cohete, también se registraron en todos los cuachalalates a excepción de la muestra del carril 8. Aunque la CCF no es un método cuantitativo, si nos permite observar la presencia de los principales principios activos. Este resultado nos muestra que los cuachalalates comercializados en las diferentes localidades tienen una calidad parecida.

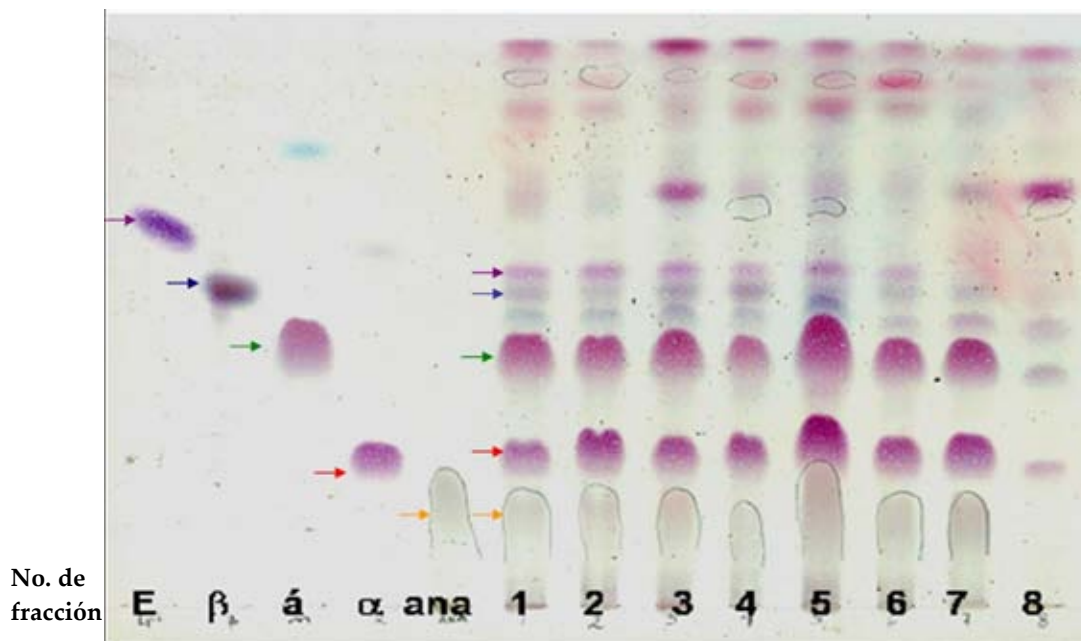


Fig. 20. Cromatografía en capa fina de EHs de cuachalalates de diferentes localidades de México. La placa se corrió con hexano-acetato de etilo (7/3) y se reveló con vainillina. Compuestos de referencia: E = ácido 3-epioleanólico; β = β -sitosterol; a = ácido masticadienónico; α = ácido 3 α -hidroximasticadienónico; ana = ácidos anacárdicos. Procedencia de los cuachalalates: 1) Jolalpan (1491); 2) Axochiapan (1490); 3) rancho campeón; 4) Zacatecas (34907); 5) Tepeaca, Puebla. (35251); 6) Zacatecas (G. Martínez 1); 7) Agua Caliente Mpio., Valparaíso, Zacatecas (corteza); 8) Agua Caliente Mpio., Valparaíso, Zacatecas (corcho).

4.5. Actividad anti-*H. pylori* in vitro de los compuestos del cuachalalate blanco y la chupandilla.

Debido a que ninguno de los compuestos con actividad anti-*H.pylori* (mezcla de ácidos anacárdicos y el ácido 3-epioleanólico) del cuacha-R fueron detectados ni en la chupandilla ni en el cuacha-B, se procedió a determinar que compuestos eran los responsables de la actividad mostrada por estas plantas.

4.5.1. Compuestos aislados del cuachalalate blanco y su actividad anti-*H. pylori* in vitro.

A partir de una CC del extracto hexánico del cuachalalate blanco, se obtuvieron 521 fracciones *fr* (de 50 ml) las cuales se juntaron por similitud en su patrón de corrimiento en CCF, en un total de 24 *fr*. Las polaridades con las que se extrajeron las 24 fracciones se indican a continuación:

- fr*1-13 hexano/cloroformo (7/3)
- fr*14 hexano/cloroformo (6/4)
- fr*15-18 hexano-cloroformo (5/5)
- fr*19 cloroformo-acetato de etilo (8/2)
- fr*20 cloroformo-acetato de etilo (6/4)
- fr*21-23 acetato de etilo-cloroformo (7/3)
- fr*24 metanol

Los colores de los residuos obtenidos de cada una de las fracciones se puede observar en los fondos de los frascos que se presentan en la Fig. 21.

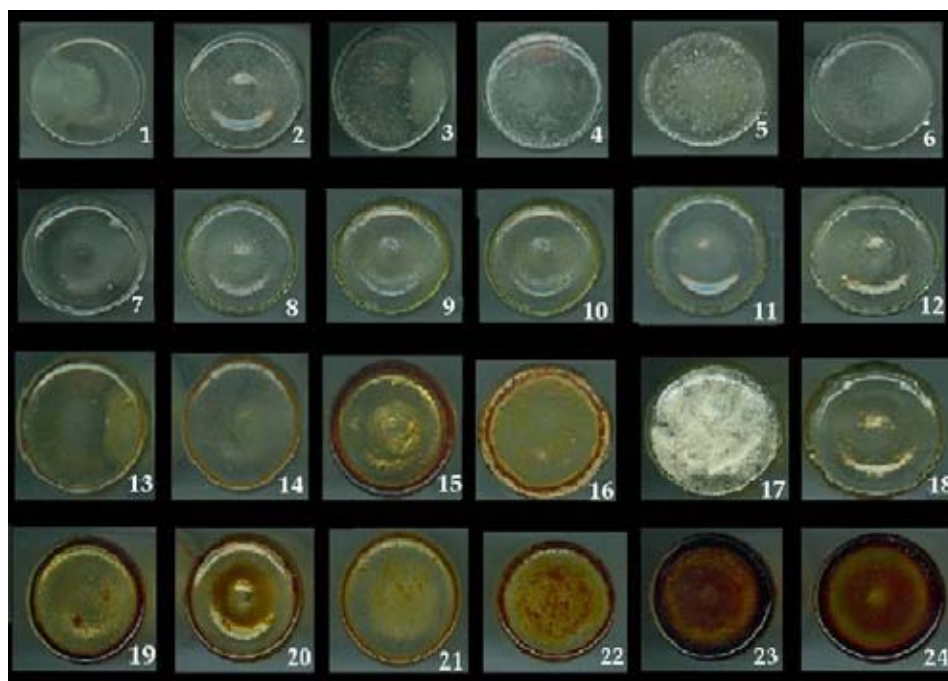


Fig. 21. Compuestos aislados del extracto hexánico del cuacha-B. a) fondos de los frascos con los residuos de las fracciones del cuacha-B (1-24).

Con estas fracciones se corrieron 4 placas de CCF para separar y extraer sus componentes, tal y como se describe en la sección de Métodos (3.5.1). A partir de estas placas se formaron 20 grupos de compuestos denominados con las letras de la A a la T (Fig. 22 a y b). Los colores de los grupos de compuestos se pueden observar en los fondos de los frascos que se presentan en la Fig. 22a.

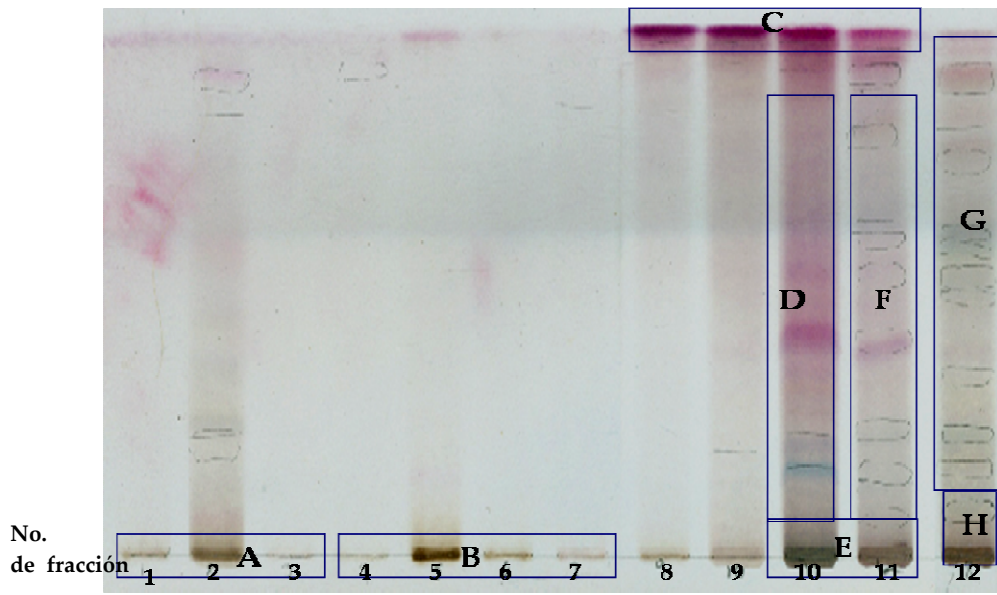


Fig. 22a. Cromatografía en capa fina de las fr1-12. La placa cromatográfica fue corrida con hexano-acetato de etilo (7/3) y se reveló con vainillina. Los grupos de compuestos (A-H) están indicados en recuadros.

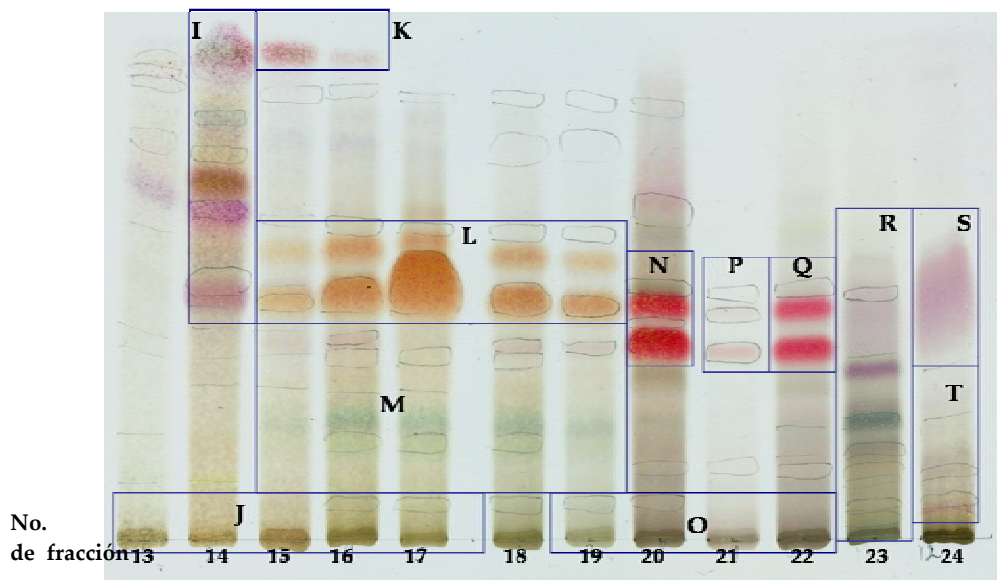


Fig. 22b. Cromatografía en capa fina de las fr13-24. La placa cromatográfica fue corrida con hexano-acetato de etilo (8/2) y se reveló con vainillina. Los grupos de compuestos (I-T) están indicados en recuadros.

Una vez aislados los grupos de compuestos se procedió a probar su actividad anti-*H. pylori*. En la Fig. 23 se presenta el porcentaje de inhibición obtenido para cada uno de los grupos de compuestos. Los grupos que tuvieron

mejor actividad inhibitoria fueron: C (102.5 %), F (87 %), I (88 %), J (105 %) y L (100 %).

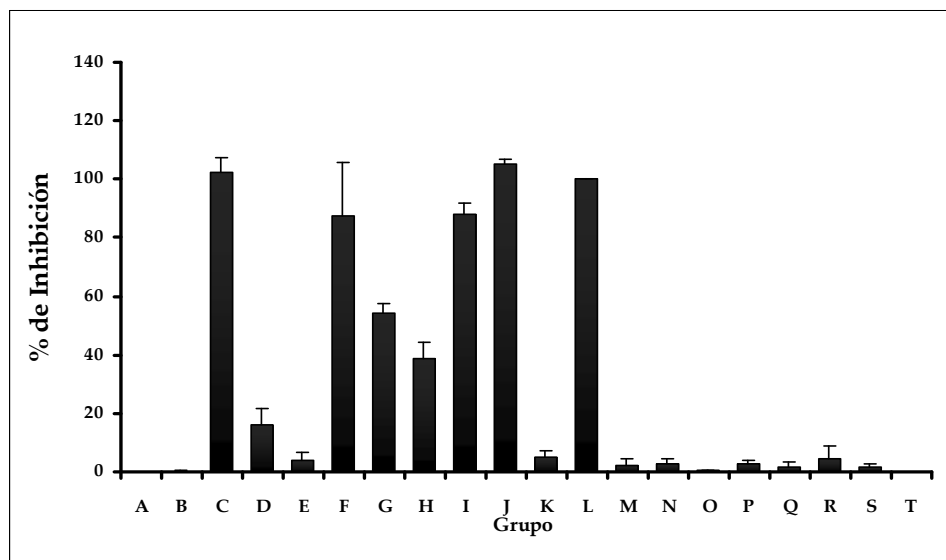


Fig. 23. Actividad anti-*H. pylori* de los grupos de compuestos aislados del cuacha-B.

4.5.2. Compuestos aislados de la chupandilla y su actividad anti-*H. pylori* *in vitro*.

De la CC del extracto hexánico de la chupandilla, se obtuvieron 16 *fr* (400 ml) las cuales se juntaron en un total de 14 *fr* de acuerdo a su patrón cromatográfico en CCF. Estas fracciones se utilizaron para separar grupos de compuestos para probar su actividad anti-*H. pylori*, de la misma manera que se hizo con el cuacha-B y como ya se indicó en la metodología.

La Fig. 24 muestra los colores de residuos obtenidos de las 14 *frs*; las polaridades utilizadas para obtener cada una de las fracciones fueron:

*fr*1 y 2 hexano a hexano-cloroformo (9/1)

*fr*3-6 hexano-cloroformo (8/2) a (6/4)

*fr*7 y 8 hexano-cloroformo (6/4) y (4/6)

*fr*9 cloroformo

*fr*10 cloroformo-acetato de etilo (8/2)

*fr*11 cloroformo-acetato de etilo (6/4)

*fr*12 cloroformo-acetato de etilo (4/6)

*fr*13 acetato de etilo

*fr*14 metanol

Los colores de los residuos obtenidos de cada una de las fracciones se puede observar en los fondos de los frascos que se presentan en la Fig. 24.

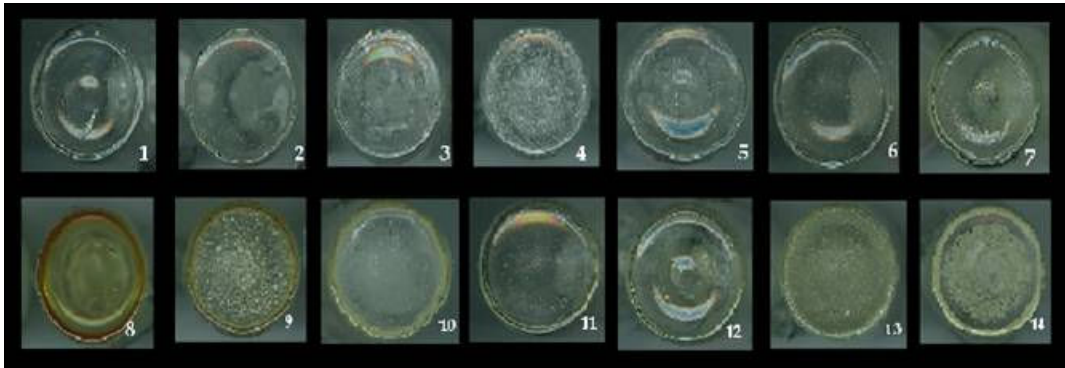


Fig. 24. Compuestos aislados del extracto hexánico de la chupandilla. a) fondos de los frascos con los residuos de las fracciones de la chupandilla (1-14).

A partir de estas fracciones, se formaron 17 grupos de compuestos (a- q) (Fig. 25a y b). En la parte superior de la placa cromatográfica, hay compuestos que corren igual, sin embargo no son los mismos.

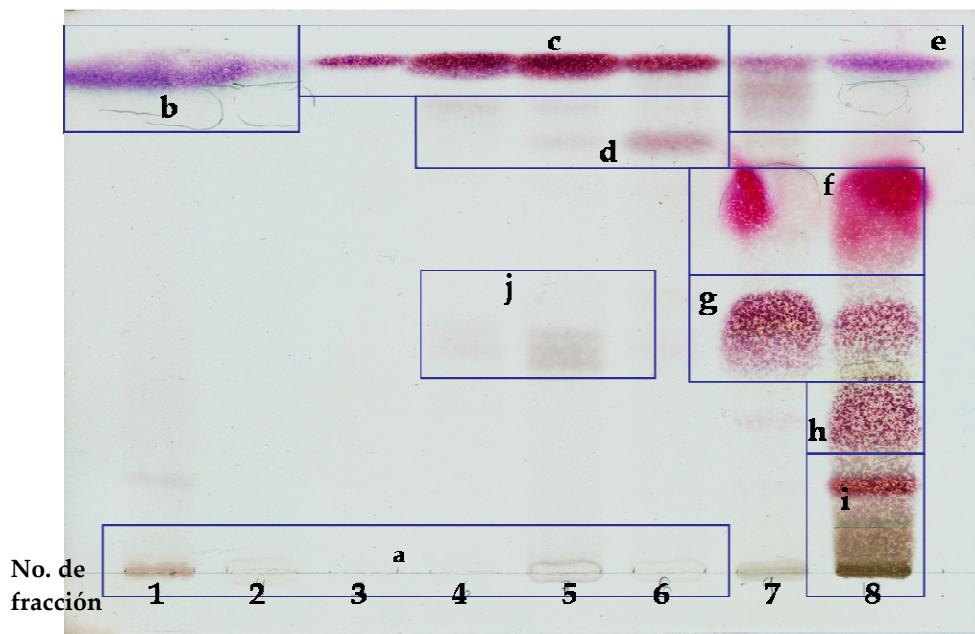


Fig. 25a. Cromatografía en capa fina de las *fr*1-8. La placa cromatográfica fue corrida con hexano-acetato de etilo (7/3) y se reveló con vainillina. Los grupos de compuestos (a-j) están indicados en recuadros.

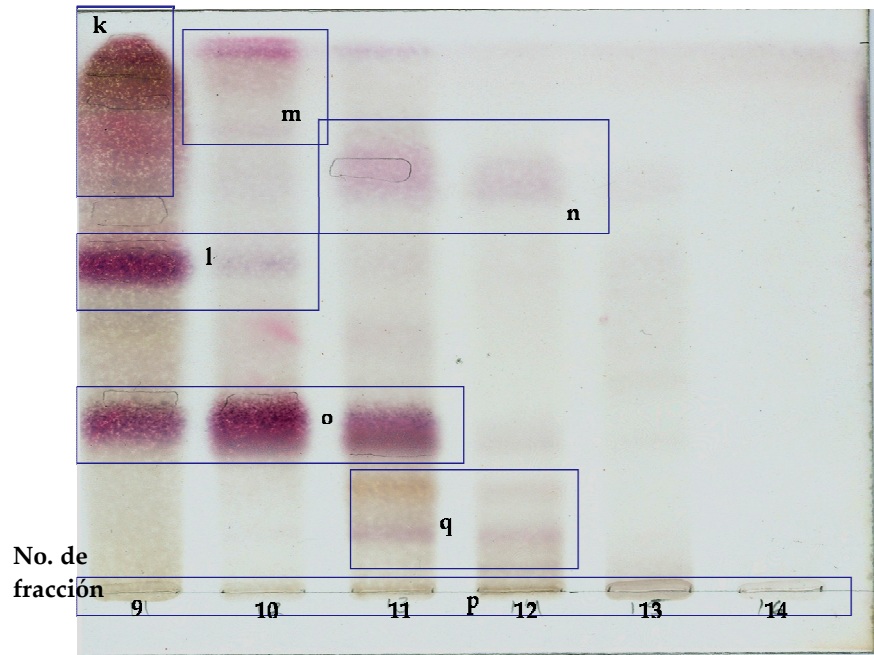


Fig. 25b. Cromatografía en capa fina de las fr9-14. La placa cromatográfica fue corrida con hexano-acetato de etilo (8/2) y se reveló con vainillina. Los grupos de compuestos (k-q) están indicados en recuadros.

La Fig. 26 muestra la actividad anti-*H. pylori* de los diferentes grupos, en donde la mejor actividad se observa en los grupos: **b** (102 %), **c** (92 %), **d** (85.5 %), **e** (83 %), **k** (110 %) y **o** (107 %).

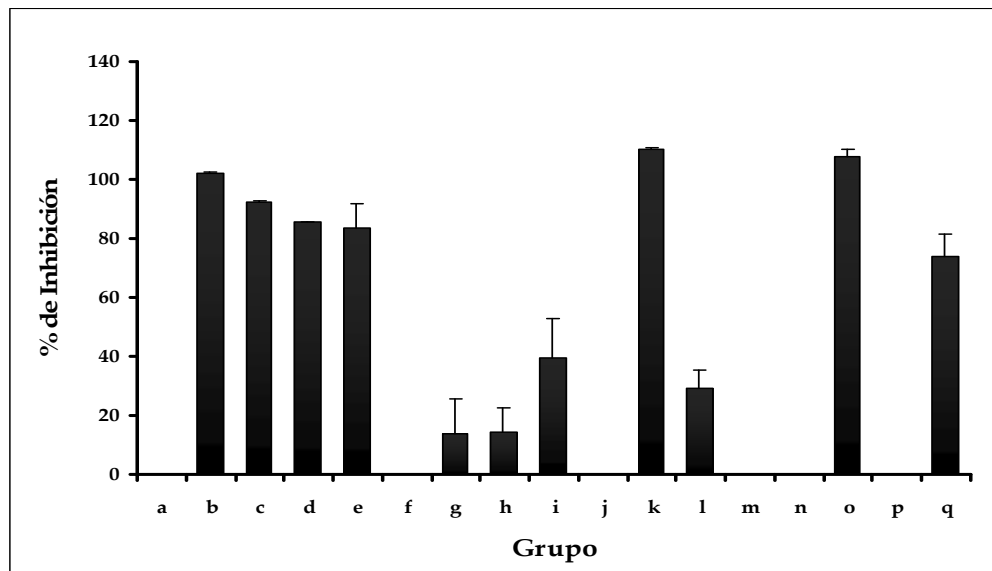


Fig. 26. Actividad anti-*H. pylori* de los grupos de compuestos aislados de la chupandilla.

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

Dado que *H. pylori* es el principal agente causal de la gastritis crónica activa y de la úlcera péptica, aunado a la dificultad que existe para erradicarla del estómago, resulta importante la realización de estudios enfocados a la búsqueda de nuevas terapias y fármacos con potencial anti-*H. pylori*.

El empleo de plantas medicinales es una práctica que en nuestro país tiene un gran valor cultural y comercial; según la Organización Mundial de la Salud el 80% de la población mundial confían en la medicina tradicional y en drogas basadas en plantas para sus principales necesidades de salud (OMS, 2004). Así también, la mayoría de los medicamentos con los que se cuentan en la actualidad derivan de productos naturales.

Aunque a nivel mundial, en los últimos 10 años a habido un auge importante sobre la investigación de productos naturales con actividad contra *H. pylori*, en México, a pesar de la gran diversidad biológica y su vasto uso de plantas medicinales, son escasos los reportes acerca de su potencial anti-*H. pylori* (Ankli *et al.*, 2002; Castillo *et al.*, 2007; Castillo *et al.*, 2009).

Una planta ampliamente utilizada en México y a la que se le ha descrito un efecto anti-*H. pylori* es la corteza de cuachalalate. Este árbol es endémico de México-Centroamérica y ha sido utilizado desde tiempos prehispánicos para el tratamiento de problemas del estómago como la gastritis, úlceras y cáncer gástrico. Su importancia en nuestro país es tal, que por su alta demanda requiere un control de uso para evitar su agotamiento. Aunado a esto, es preciso decir que es una especie que no se cultiva y está en peligro de extinción y actualmente se encuentra bajo la norma NOM-059-ECOL-2001.

De esta planta se han hecho diversos estudios fitoquímicos y se han encontrado compuestos activos de naturaleza terpénica con propiedades gastroprotectoras (González *et al.*, 1962; Navarrete *et al.*, 1986; Benitez, 1998; Navarrete *et al.*, 1998) y antiinflamatorias (Navarrete *et al.*, 1982; Olivera *et al.*,

1999). Así mismo, recientemente se encontró que el ácido 3-epioleanólico y una mezcla de ácidos anacárdicos tienen actividad anti-*H. pylori* (Castillo-Juárez *et al.*, 2007).

Un punto muy importante que hay que señalar es que en nuestro país aún no se realizan controles de calidad a las plantas que se comercializan, de tal forma que en muchas ocasiones se plantea que hay adulteración de ciertas especies con gran demanda, por otras que pueden no tener ningún efecto o ser altamente tóxicas.

Por otra parte, Linares y Bye plantean que no siempre existe una adulteración como tal si no que ésta dinámica obedece a lo que ellos denominan “complejos de plantas medicinales” (Linares y Bye, 1987), en el que un complejo está formado por un grupo de plantas que comparten entre otras muchas propiedades una misma actividad biológica. Estas pueden estar agrupadas por nombre común o características morfológicas similares pero se les atribuye propiedades curativas análogas. La forma en que funcionan estos complejos se basa en sustituir una planta “tipo” que es la más utilizada y que en determinado momento por escasez, o para evitar su agotamiento, es sustituida por otras del complejo, pero que mantienen una actividad similar.

Teniendo en consideración estas dos ideas (adulteración o complejo) exploramos la posible actividad anti-*H. pylori* de dos cortezas las cuales se compararon con la del cuachalalate rojo. Una de estas fue el cuachalalate blanco que además de coincidir con un nombre común, se le atribuye un uso tradicional parecido al del cuachalalate. Cabe mencionar que en la bibliografía esta planta no aparece con el nombre vulgar de cuachalalate blanco, sino que es información obtenida en Tepeaca, Puebla (Linares y Bye, 2008; Comunicación personal). La otra planta fue la chupandilla, la cual se eligió porque se ha reportado que el cuachalalate se adultera con esta planta (Rosas *et al.*, 2001).

Un aspecto importante en favor de la idea de un posible “complejo cuachalalate” más que de adulteración, sería la presencia de los compuestos

activos del cuachalalate rojo en las otras dos cortezas, o de otros que puedan ejercer un efecto anti-*H. pylori*. Al respecto Rosas y colaboradores en 2001 reportan, en un Resumen para el XV Congreso Mexicano de Botánica, haber encontrado en la corteza de la chupandilla únicamente el β -sitosterol y registraron los terpenos masticadienónico y α -hidroximasticadienónico, por lo tanto concluyen que ésta planta no tendrá el mismo efecto gastroprotector-antiulceroso que el cuachalalate rojo. No obstante existen reportes en los que el β -sitosterol aislado de cuachalalate rojo muestra un efecto gastroprotector-antiulceroso aunque en menor proporción que los terpenos, 75% con 3 mg/kg (Benitez-Yañez, 1998) y 48% a dosis 100 mg/kg (Arrieta *et al.*, 2003). Bajo esta misma idea y de que los metabolitos secundarios se encuentran restringidos a cierto grupo de plantas o familias, tal es el caso de los ácidos anacárdicos, los cuales están presentes en algunos miembros de la familia Anacardiaceae como es el caso de la nuez de la india, *Anacardium occidentale* y que tienen actividad inhibitoria contra *H. pylori* (Kubo *et al.*, 1999), cabría la posibilidad de que la chupandilla los presentara y de esta manera ejerciera su efecto anti-*H. pylori*. Este tipo de compuestos son los principales responsables del efecto anti-*H. pylori* mostrado por el cuachalalate rojo, el cual actualmente se ubica dentro de la familia Anacardiaceae, misma a la que pertenece la chupandilla, aunque en el único estudio fitoquímico realizado a la corteza de chupandilla no se reportó este tipo de compuestos.

Hay que aclarar que el objetivo de este trabajo no fue tratar de hacer la caracterización extensiva de un posible complejo “cuachalalate”, sino solamente nos limitamos a tratar de encontrar especies relacionadas y que fueran de relativamente fácil disponibilidad comercial, con el objeto de analizar su actividad anti-*H. pylori*.

El primer paso para este estudio fue probar el efecto anti-*H. pylori* de los extractos acuosos y metanólicos *in vitro* del cuachalalate blanco y la chupandilla. Es necesario mencionar que, aún no existe una metodología

estandarizada mundialmente para determinar la actividad de extractos de plantas contra la bacteria, en los últimos años se ha empezado a considerar el método recomendado por la CLSI para determinar la susceptibilidad de compuestos contra *H. pylori*, por lo cual en éste trabajo se siguieron dichas recomendaciones únicamente para los extractos acuosos. En el caso de los metanólicos no fue así, debido a que en estos existen compuestos menos polares que no se solubilizan en el agar, por lo que se determinó su actividad, sin problemas de solubilidad, en cultivos líquidos. Por estas razones es necesario realizar el análisis de los resultados por separado ya que en cada uno de los extractos es diferente el tipo y la concentración de metabolitos. La actividad que muestre el extracto acuoso será importante, ya que este tipo de preparación es lo que la gente utiliza para el tratamiento específico de gastritis y úlceras. No obstante, en el extracto metanólico es donde se encuentran los metabolitos activos reportados para el cuachalalate rojo y el extracto acuoso carece de ellos (Fig. 18). Sin embargo, debemos considerar que nuestros extractos acuosos, son filtrados después de la decocción y la forma más generalizada de uso tradicional, es la preparación de infusiones o la maceración de la corteza para consumirse como agua de uso. Esto implica que no se filtra y que las partículas de la corteza, contenedoras de los compuestos activos, podrían ser ingeridas de esta manera. Los compuestos activos también se encuentran en los extractos hexánicos (Fig. 20) de cortezas provenientes de diferentes localidades de la República Mexicana. Es importante mencionar que la colecta de estas cortezas fue distinta, ya que se obtuvieron bajo diversas condiciones y en diferentes épocas del año. Una de las cortezas, la de Agua Caliente, Zacatecas, fue obtenida de un árbol virgen, es decir, que no había sido descortezado anteriormente. Por esta razón se tuvo la oportunidad de hacer dos extractos, uno de corteza que contenía resina y otro de los pliegues; osea el corcho. En ambos se encuentran los principios activos, aunque la parte del corcho los tiene en menor proporción (Fig. 20). En conclusión, todos los cuachalalates

procedentes de localidades distintas presentan los compuestos de referencia, aunque su proporción puede variar. Podemos decir que la calidad de estos productos es parecida a pesar de provenir de diferentes lugares.

Los extractos acuosos de las cortezas del cuachalalate blanco y de la chupandilla, no presentaron los metabolitos activos contra *H. pylori* (ácido 3-epioleanólico y ácidos anacárdicos) al igual que el extracto acuoso del cuachalalate rojo (Fig. 18). Sin embargo, se registró una actividad anti-*H. pylori* por parte del extracto acuoso de cuachalalate rojo (CMI = 500 µg/ml) y una actividad mayor en la chupandilla (CMI = 62.5 µg/ml). Este resultado es importante ya que sugiere la presencia de compuestos activos diferentes a los del cuachalalate. Al respecto, se ha reportado la presencia de saponinas en los extractos acuosos de ambas cortezas (cuachalalate rojo y chupandilla); compuestos, que en la corteza de la planta Brasileña *Pteleopsis suberosa* de la familia Combretaceae (De Leo *et al.*, 2006), han mostrado tener un efecto contra *H. pylori*. Por lo tanto, es posible que estas sustancias sean las responsables de la inhibición que encontramos.

Por otra parte, el extracto acuoso del cuachalalate blanco no mostró ningún efecto sobre la bacteria, lo que sugiere que su acción no será la misma que las otras dos cortezas del “complejo” hipotético. Sin embargo, este extracto podría tener algún efecto gastroprotector-antiulceroso que podría justificar su pertenencia al complejo.

Los extractos metanólicos del cuachalalate rojo y del cuachalalate blanco presentaron una buena actividad inhibitoria con valores de CMI de 7.9 y <3.95 µg/ml, respectivamente. La CMI de la chupandilla fue de >500 µg/ml, esto quiere decir que no se inhibió al 100% el crecimiento de las bacterias a esa concentración. Al analizar por CCF los extractos metanólicos (Fig. 19), los compuestos activos del cuachalalate rojo no están presentes en el del cuachalalate blanco, de tal manera que su actividad es debida a otros compuestos. Para el caso de la chupandilla sólo se registra el β-sitosterol.

Rodríguez-López *et al.*, 2006, identificaron en la corteza de la chupandilla, dos compuestos derivados de ácidos grasos (el pentadecil benceno y el eicosil benceno) cuya estructura es similar a la de los ácidos anacárdicos pero sin sustituyentes químicos en el anillo. Estas sustancias, por la semejanza con los ácidos anacárdicos, podrían ser las responsables del 88% en la inhibición del crecimiento de *H. pylori* que encontramos (Tabla 6). Así mismo, las diferencias químicas de éstas moléculas podrían afectar el corrimiento de estos compuestos en la CCP y por esto no son detectados como los ácidos anacárdicos.

En el caso del extracto metanólico del cuachalalate blanco, la inhibición es muy drástica y significativa, ya que sigue con una concentración de 3.95 µg/ml y obtenemos el 100% de inhibición, sin embargo, queda por determinar si en el extracto existe algún compuesto que sea tóxico para las células humanas y que sea el responsable de este importante efecto anti-*H. pylori*.

Cuando comparamos las CMI de los extractos con los antibióticos de referencia amoxicilina y metronidazol (Tabla 7) podemos observar que la CMI del EA de la chupandilla es cercana al valor y los EMs del cuachalalate rojo y cuachalalate blanco mejoran los valores de CMI del metronidazol. Esto nos indica el potencial de estas plantas en el desarrollo de terapias anti-*H. pylori*.

En cuanto a los métodos de separación para identificar los compuestos con actividad anti-*H. pylori* de la chupandilla y del cuachalalate blanco, se utilizó una extracción con hexano ya que con éste se obtiene una mayor cantidad de metabolitos (Fig. 19). Posteriormente el extracto hexánico se sometió a cromatografía en columna y en el caso de la chupandilla se utilizó una columna denominada “flash”. Con ambas se logró separar una serie de metabolitos, aunque la segunda tiene la ventaja de ser mucho más rápida y utiliza menos material.

En el caso del método de “raspado de placas cromatográficas” para extraer los metabolitos y probar la actividad anti-*H. pylori*, resultó ser un

método adecuado para nuestro objetivo, aunque puede tener limitantes como es la pérdida de material y/o de actividad de los compuestos.

En cuanto a los compuestos activos del cuachalalate blanco que son responsables del efecto anti-*H. pylori*, los grupos denominados C, J y L inhiben el 100% del crecimiento de la bacteria, mientras que los grupos F, G, H, I y D, los cuales corresponden a mezclas de compuestos que no se resolvieron bajo las condiciones utilizadas en CCF, fueron menos activos que los tres primeros (Fig. 22a y b).

En la chupandilla a pesar de que el extracto metanólico no inhibió el 100% del crecimiento de la bacteria, los grupos de compuestos b, k y o, inhibieron al 100% el crecimiento de la bacteria. Esto puede deberse a la concentración de los compuestos ensayada en cada experimento.

Estos resultados indican que los principios activos del extracto metanólico y hexánico de la chupandilla y del cuachalalate blanco, son diversos y diferentes a los del cuachalalate rojo.

En resumen, los resultados muestran que las cortezas del cuachalalate blanco y de la chupandilla presentan una buena actividad anti-*H. pylori* por lo menos en alguno de los extractos estudiados. De los extractos hexánicos de estas plantas se identificaron grupos de compuestos que también tienen una buena actividad contra la bacteria, aunque aún hacen falta estudios para lograr su identificación. En el caso de la chupandilla son pocos los estudios fitoquímicos y no hay trabajos de este tipo reportados para el cuachalalate blanco.

Con los resultados obtenidos, en este trabajo se da un paso más en la búsqueda de compuestos con actividad anti-*H. pylori* derivados de plantas y se brinda información del modo de acción que estas plantas pueden tener en la cura de enfermedades relacionadas con *H. pylori*. Este conocimiento permitirá enriquecer la Farmacopea Mexicana.

Así las plantas con propiedades curativas constituyen un recurso terapéutico importante para la medicina tradicional mexicana, no solo para obtener fármacos, sino para preservar y valorar este conocimiento.

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

- Los **compuestos activos** con propiedades gastroprotectoras-antiulcerosas, antiinflamatorias y anti-*H. pylori* reportados para el cuachalalate rojo se pudieron identificar en todas las cortezas estudiadas de cuachalalate provenientes de diferentes localidades.
- Los únicos **extractos acuosos** que mostraron una actividad anti-*H. pylori* fueron los del cuachalalate rojo y la chupandilla. Siendo mucho más activo el de la segunda (CMI = 62.5 µg/ml).
- Ninguno de los compuestos activos del cuachalalate rojo están presentes en los extractos acuosos de las tres cortezas, por lo que el efecto anti-*H. pylori* registrado para el cuachalalate rojo y la chupandilla es debido a otros compuestos aún no identificados.
- El **extracto metanólico** de las tres cortezas presentaron actividad, destacando la presentada por el del cuachalalate blanco (CMI = <3.95 µg/ml).
- La actividad anti-*H. pylori* de las tres cortezas es debida a compuestos diferentes.
- Las tres plantas comparten algunas características que justificarían su pertenencia a un “complejo” cuachalalate mas que a la adulteración. Entre los factores que las relacionan estan: distribución geográfica parecida, la parte de la planta utilizada tradicionalmente (la corteza) así como una misma actividad biológica ya que las tres mostraron, por lo menos en alguno de los extractos, una buena actividad anti-*H. pylori*.

6.1. Perspectivas para estudios futuros.

- Análisis de la toxicidad de los extractos de ambas plantas.
- Análisis de los compuestos activos de los extractos acuosos.
- Aislamiento e identificación de los compuestos activos de los extractos hexánicos de las dos plantas.
- Determinación de la actividad anti-*H. pylori in vitro* de los compuestos que se identifiquen.
- Análisis de su actividad *in vivo*.

BIBLIOGRAFÍA

- Albenque, M., Tall, F., Dabis, F. y Mégraud, F. (1990). Epidemiological study of *Helicobacter pylori* transmission from mother to child in Africa. *Rev. Esp. Enferm. Digest.* 78(1): 48.
- Allison, M., Bergman, T. y Gerszten, E. (1999). Further studies on fecal parasites in antiquity. *Am. J. Clin. Pathol.* 112(5): 595-596.
- Álvarez, J. R. (1998). Enciclopedia de México. USA.
- Ankli, A., Heinrich, M., Bork, P., Wolfram, L., Bauerfeind, P., Brun, R., Schmid, C., Weiss, C., Bruggisser, R., Gertsch, J., Wasescha, M. y Sticher, O. (2002). Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. *J. Etnofarmacol.* 79: 43-52.
- Argueta, V., Cano, J. y Rodarte, M. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana: Instituto Nacional Indigenista. México. Vol. 1, pp 58.
- Argyros, F., Ghosh, M., Huang, L., Masubuchi, N., Cave, D., Cave, D. y Grübel, P. (2000). Evaluation of a PCR Primer Based on the Isocitrate Dehydrogenase Gene for Detection of *Helicobacter pylori* in Feces. *J. Clin. Microbiol.* 38(10): 3755-3758.
- Arrieta, J., Benítez, Y., Flores, E., Castillo, C. y Navarrete, A. (2003). Purification of Gastroprotective Triterpenoids from the Stem Bark of *Amphipterygium adstringens*; Role of Prostaglandins, Sulfhydryls, Nitric Oxide and Capsaicin-Sensitive Neurons. *Plant. Med.* 69(10):905-909.
- Asaka, M., Sepúlveda, A. R., Sugiyama, T. y Graham, D. Y. (2001). Gastric cancer. En: *Helicobacter pylori*. Physiology and genetics. (Eds. Mobley, H. L. T., Mendz, G. L. y Hazell, S. L.). ASM Press Washington, pp. 481-498.
- Axon, A. T. R. (1995). Review article: is *Helicobacter pylori* transmitted by the gastro-oral route? *Aliment. Pharmacol. Ther.* 9: 585-588.
- Baytelman, G. y Avilés, F. (1981). Recetario Popular. SEP-INAH. México, pp. 21.
- Benitez-Yañez, J. (1998). Evaluación farmacológica del efecto gastroprotector de los triterpenoides de la corteza de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) en ratas wistar. Tesis de Licenciatura Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, p. 117.
- Bizzozero, G. (1893). Ueber die schlauchformigen drusen des magendarmkanals und die beziehungen ihres epithels zu dem oberflachenepithel der schleimhaut. *Arch. Mikr Anat.* 42: 82.
- Blaser, M. J. (1992). Hypothesis on the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Gastroenterol.* 102(2): 720-727.
- Blaser, M. J. (1997). Not all *Helicobacter pylori* strains are created equal: should all be eliminated? *Lancet.* 349(9057):1020-1022.
- Blaser, M. J. (1998a). *Helicobacters* are indigenous to the human stomach: duodenal ulceration is due to changes in gastric microecology in the modern era. *Gut.* 43:721-727.

- Blaser, M. J. (1998b). The interaction of *cagA Helicobacter pylori* strain with their hosts. En: *Helicobacter pylori: basic mechanisms to clinical cure*. (Eds. Hunt R. y Tytgat G.) Academic. Dordrecht, Holanda, pp. 27-32.
- Blaser, M. J. (1999a). Hypothesis: The Changing Relationships of *Helicobacter pylori* and Humans: Implications for Health and Disease. *J. Infect. Dis.* 179:1523-1530.
- Blaser, M. J. (1999b). In a World of Black and White, *Helicobacter pylori* Is Gray. *Ann. Inter. Med.* 130(8):695-697.
- Bravo, L., Bermudez, T. y Montes, B. (2000). Inhibición de *Fusarium moniliforme* mediante polvos vegetales y algunos de sus componentes químicos. *Rev. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*. 57:29-34
- Bye, R., Estrada, L. y Linares, E. (1991). Recursos genéticos en plantas medicinales de México. En *Avances en los estudios de los recursos fitogenéticos de México* (Eds. Ortega, P., Palomino, H., Castillo, G., González, H. y Libera, M.). Sociedad mexicana de Fitogenética, A. C. Chapingo, México, pp. 341-359
- Cabrera, L. (1980). *Diccionario de Aztequismos*. Ediciones Oasis. México, pp 166.
- Cabrera, T., Casas, F., Rojas, C. y Viveros, S. (1998). Alimentos de la naturaleza. Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, México D. F.
- Canales, M. M., Hernández, D. T., Caballero, N. J., Romo de Vivar, R. A., Avila, G., Duran, D. A. y Lira, S. R. (2005). Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. *J. Ethnopharmacol.* 97: 429-439.
- Cassel-Beraud, A. M., Le Jan, J., Mouden, J. C., Andriantsoa, M. y Andriantsiferana, R. (1991). Preliminary study of the prevalence of *Helicobacter pylori* in Tananarive, Madagascar and the antibacterial activity *in vitro* of 13 Malagasy medicinal plants on this germ. *Arch. Inst. Paster de Madagascar* 59(1): 9-23.
- Castillo-Juárez I., González, A. V., Jaime-Aguilar, H., Martínez, G., Linares, E., Bye, R. y Romero, I. (2009). Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *J. Ethnopharmacol.* 122(2): 402-405.
- Castillo-Juárez, I., Rivero-Cruz, F., Celis, H. y Romero, I. (2007). Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. *J. Ethnopharmacol.* 114(1):72-77.
- Castillo-Juárez, I. y Romero, I. (2007). Plantas con actividad anti-*Helicobacter pylori*: una revisión. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 80:35-61.
- Cellini, L., Allocati, N., Piattelli, A., Petrelli, I., Fanci, P. y Dainelli, B. (1995). Microbiological evidence of *Helicobacter pylori* from dental plaque in dyspeptic patients. *The New Microbiol.* 18(2): 187-192.
- Centeno-Betanzos, L. (2007). Comparación Anatómica e histoquímica de corteza y madera del Guayacán del Mercado de uso medicinal con *Guaiacum coulteri* (Zygophyllaceae) de la Xiloteca MEXUw. Tesis Profesional, Biología, UNAM, p. 104.

- Chávez-Servia, J., Tuxill, J. y Jarvis, D. (2004). Manejo de la diversidad de los cultivos en los agroecosistemas tradicionales. Instituto Internacional de Recursos Filogenéticos, Cali, Colombia, p. 286.
- Chow, T., Lambert, J., Wahlqvist, M. L. y Hsu-Hage, B. (1995). *Helicobacter pylori* in Melbourne Chinese immigrants: Evidence for oral-oral transmission via chopsticks. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 10(5): 562-569.
- Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. (2001). Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, Extrafarmacopea Herbolaria, Secretaría de Salud, Ciudad de México, México, pp. 12-15.
- Craanen, M. E., Dekker, W., Block, P., Ferwerda, J. y Tytgat, G. N. (1992). Intestinal metaplasia and *Helicobacter pylori*: an endoscopic bioptic study of the gastric antrum. *Gut* 33(1): 16-20.
- Cuevas F., X. (2005). A revision of the genus *Amphipterygium* (Julianiaceae). *Bol. IBUG.* 13(1): 27-47.
- De Leo, M., De Tomás, N., Sanogo, R., D'Angelo, V., Germanò, M. P., Bisignano, G. y Braca, A. (2006). Triterpenoid saponins from *Pteleopsis suberosa* stem bark. *Phytochem.* 67: 2623-2629.
- Dehesa, V. M. (1993). Métodos de diagnóstico en infección por *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol.* 58(2): 87-95.
- Ding, H. (1978). Anacardiaceae. En: Flora malesiana (Ed. Steenis C. G.). Sijthoff & Noordhoff, Alphen van der Rijn. Vol 8, pp. 395-548.
- Dixon, M. F. (2001). Pathology of Gastritis and Peptic Ulceration. En: *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. (Eds. Mobley H. L. T., Mendz G. L. y Hazell S. L.). ASM Press, Washington, pp. 459-469.
- Don, J. B., Noel, R. K. y James, T. S. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Edition. Vol. 2. The Proteobacteria, Part C, p. 1169.
- Dore, M. P., Sepúlveda, A. R., El-Zimaity, H., Yamaoka, Y., Osato, M. S., Mototsugu, K., Nieddu, A. M., Realdi, G. y Graham, D. Y. (2004). Isolation of *Helicobacter pylori* from sheep-implications for transmission to humans. *Am. J. Gastroenterol.* 96(5): 1396-1401.
- Du, M., Diss, T. C., Xu, C., Peng, H., Isaacson, P. G. y Pan L. (1996). Ongoing mutation in MALT lymphoma immunoglobulin gene suggests that antigen stimulation plays a role in the clonal expansion. *Leukemia.* 10(7): 1190-1197.
- Dye, K. R., Marshall, B. J., Frierson, H. F. Jr., Pambianco, D. J. y McCallum, R. W. (1990). *Campylobacter pylori* colonizing heterotopic gastric tissue in the rectum. *Am. J. Clin. Pathol.* 93(1): 144-147.
- Ernst, P. B. y Gold, B. D. (2000). The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 615-640.
- Estrada, L. (1985). Avances en las investigaciones sobre plantas medicinales en la Universidad Autónoma de Chapingo y Colegio de Postgraduados, Chapingo

Estado de México. Mimeógrafo. Departamento de Fitotecnia, Sección de Plantas Medicinales Universidad Autónoma de Chapingo.

- Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, 2001, *Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schltdl. Secretaría de Salud, México, pp. 12 - 15.
- Ferguson, D. A., Chuanfu, LI., Patel, N. R., Mayberry, W. R., Chi, D. S. y Thomas, E. (1993). Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva. *J. Clin. Microbiol.* 31(10): 2802-2804.
- Geis, G., Suerbaum, S., Forsthoff, B., Leying, H. y Opferkuch, W. (1993). Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. *J. Med. Microbiol* 38(5): 371-377.
- Gill, H. H. y Desai, H. G. (1993). *Helicobacter pylori* and gastroduodenal disorders in India-lesson from epidemiology. *J. Clin. Gastroenterol.* 16(1): 6-9.
- Glupczynski, Y., Bourdeaux, L., Verhas, M., DePrez, C., De Vos, D. y Devreker, T. (1992). Use of urea breath test versus invasive methods to determine the prevalence of *Helicobacter pylori* in Zaire. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 11(4): 322-327.
- González, E. E., McKenna, G. F. y Delgado, J. N. (1962). Anticancer activity of *Amphipterygium adstringens*. *J. Pharm. Sci.* 51(9): 901-903.
- González, E. E. y Delgado, J. N. (1962). Phitochemical investigation of *Amphipterygium adstringens*. *J. Pharm. Sci.* 51: 786-790.
- Goodwin, C. S., Armostrong, J. A., Chilvers, T., Peters, M., Collins, M. D., Sly, L., McConnel, W. y Harper, W. E. S. (1989). Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helycobacter pylori* comb. Nov. and *Campylobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int. J. Sist Bacteriol.* 39: 397-405.
- Goodwin, C. S. y Armstrong, J. A. (1990). Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur. J. Clin. Microbiol. & Inf. Dis.* 9(1): 1-13.
- Graham, D., Lu, H. y Yamaoka, Y. (2008). Therapy for *Helicobacter pylori* Infection Can be Improved. *Drugs.* 68(6):725-736.
- Gray, A. (1897). Synoptical Flora if North America. America Book Company, New York.
- Grayum, M., González, J., Quesada, F. y Cano, C. (2008). Herbario: CR, MO. 10706. disponible en: Michael Grayum, J. González, F. Quesada & C. Cano 10706.
- Gros, G., Pomilio, B., Seldes, M. y Burton, G. (1985). Introducción al estudio de los productos naturales. Departamento de Química Orgánica, Fac. de Ciencias Exactas. Universidad de Buenos Aires, Argentina, p. 80.
- Gur, G., Boyacioglu, S., Gül, C., Turan, M., Gürsoy, M., Baysal, C. y Özdemir, N. (1999). Impact of *Helicobacter pylori* infection on serum gastrin in haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Trasplant.* 14: 2688-2691.

- Hannula, M. y Marja-Liisa, H. (2007). Phylogenetic analysis of *Helicobacter* species based on partial gyrB gene sequences. *Int. J. Syst. & Evol. Microbiol.* 57(3): 444-449.
- Hansen, P. S., Go, M. F., Varming, K., Andersen, L. P., Genta, R. M., Graham, D. Y. y Nielsen, H. (1999). Proinflammatory Activation of Neutrophils and Monocytes by *Helicobacter pylori* in Patients with Different Clinical Presentations. *Infect. Immun.* 67(6): 3171-3174.
- Hazell, S. L., Evans, D. J. Jr. y Graham, D. Y. (1991). *Helicobacter pylori* catalase. *J. Gen Microbiol.* 137(1): 57-61.
- Herbarth, O., Krumbiegel, P., Fritz, G. J., Richter, M., Schlink, U., Müller, D. M. y Richter, T. (2001). *Helicobacter pylori* Prevalences and Risk Factors among School Beginners in a German Urban Center and its Rural County. *Environ. Health Perspect.* 109(6): 573-577.
- Hersch-Martínez, P. (1995). Comercialization of wild medicinal plants from southwest Puebla, México. *Econ. Botany.* 49(2): 197-206.
- Heywood, V. (1978). Flowering plants of the world. Oxford University Press Oxfor.
- Holly, M., Scott, A. y Timothy, L. C. (2006). *Helicobacter pylori* Persistence: an Overview of Interactions between *H. pylori* and Host Immune Defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* 19(4): 597-613.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 1994. Infection with *Helicobacter pylori*. Schistosomes, Liver flukes and *Helicobacter pylori*. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks. Hum.* 61:1-241.
- IMEPLAN (1978). Plantas medicinales mexicanas con uso popular. Vol 1, pp. 5-21.
- INI (1994). Atlas de las plantas medicinales tradicionales mexicanas. Tomo II. Instituto Nacional Indigenista. México, D. F.
- INIFAP (2002). Especies no maderables de clima tropical seco. Técnicas de descortezamiento para hacer un uso sustentable de la corteza de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht.) para su uso medicinal. Ficha Tecnológica, SAGARPA.
- Innocenti, M., Svennerholm, A. M. y Quiding-Järbrink, M. (2001). *Helicobacter pylori* Lipopolysaccharides Preferentially Induce CXC Chemokine Production in Human Monocytes. *Infect Immun.* 69(6): 3800-3808.
- Judd, W., Campbell, C., Kellogg, E., Stevens, P. y Donoghue, M. (2002). Plant systematics, a phylogenetic approach, 2nd ed. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, p. 576.
- Krajden, S., Fuksa, M., Anderson, J., Kempston, J., Boccia, A., Petrea, C., Babida, C., Karmali, M. y Penner, J. L. (1989). Examination of Human Stomach Biopsies, Saliva, and Dental Plaque for *Campylobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 27(6): 1397-1398.
- Kubo, J., Lee, J-R. y Kubo, I. (1999). Anti-*Helicobacter pylori* Agents from the Cashew Apple. *J. Agric. Food. Chem.* 47: 533-537.

- Kuipers, E. J. (1999). Review article: exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 13(1): 3-11.
- Kuipers, E. J., Thijs, J. C. y Festen, H. P. (1995). The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 9(2): 59-69.
- Kusters, J. G., Van Vliet, A. H. y Kuipers, E. J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 19(3): 449-490.
- Lee, A., Dixon, M. F., Danon, S. J., Kuipers, E., Megraud, F., Larsson, H. y Mellgard, B. (1995). Local acid production and *Helicobacter pylori*: a unifying hypothesis of gastroduodenal disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 7(5): 461-465.
- Linares, E. y Bye, R. (1987). A study four medicinal plant complexes of Mexico and adjacent United States. *J. Ethnopharmacol.* 19: 153-183.
- Linz, B., Balloux, F., Moodley, Y., Manica, A., Liu, H., Roumagnac, P., Falush, D., Stamer, C., Prugnolles, F., Van der Merwe, S. W., Yamaoka, Y., Graham, D. Y., Pérez-Talleros, E., Wadstrom, T., Suerbaum, S. y Achtman, M. (2007). An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* 445: 915-918.
- Logan, R. P. H. y Walker, M. M. (2001). ABC of the upper gastrointestinal tract. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *BMJ.* 323(7318): 920-922.
- López, R. e Hinojosa, A. (1988). Catálogo de plantas medicinales sonorenses. Universidad de Sonora, México. 143.
- Magdaleno, R. (1987). La farmacia del campo. De Balsas editores S. A. Morelia Mich., México, p. 125.
- Mahato, S. B. y Sen, S. (1997). Advances in triterpenoid research. *Phytochemistry.* 44(7): 1185-1236.
- Makino, M., Motegi, T. y Fujimoto, Y. (2004). Tirucallane-typetriterpenes from *Juliana adstringens*. *Phytochem.* 65: 891-896.
- Malaty, H. M. y Graham, D. Y. (1994). Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut.* 35(6): 742-745.
- Malaty, H. M., Kumagai, T., Tanaka, E., Ota, H., Kiyosawa, K., Graham, D. Y., Katsuyama, T. (2000). Evidence from a Nine-Year Birth Cohort Study in Japan Transmission Pathways of *Helicobacter pylori* Infection. *J. Clin. Microbiol.* 38(5): 1971-1973.
- Marshall, B. J. y Goodwin, C. S. (1987). Revised Nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37(1): 68.
- Marshall, B. J., Armstrong, J. A., Mc Geachie, D. B. y Glancy, R. J. (1985). Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med. J. Austr.* 142(8): 436-439.
- Martínez, M. (1987). Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de cultura económica, México, p. 1247.

- Mata, R., Calzada, F., Navarrete, A., Del Río, F. y Delgado, G. (1991). Long-chain phenols from the bark of *Amphipterygium adstringens*. *J. Ethnopharmacol.* 34(2-3): 147-154.
- Mitchell, H. M. (2001). Epidemiology of Infection. En: *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics (Eds. Mobley, H. L. T., Mendz, G. L. y Hazell, S. L.). ASM Press Washington, pp. 7-18.
- Mitchell, H. M., Lee, A. y Carrick, J. (1989). Increased Incidence of *Campylobacter pylori* Infection in Gastroenterologists: Further Evidence to Support Person-to-Person Transmission of *C. pylori*. *Scand. J. Gastroenterol.* 24(4):396-400.
- Mitchell, J. D., Mitchell, H. M. y Tobias, V. (1992). Acute *Helicobacter pylori* infection in an infant, associated with gastric ulceration and serological evidence of intra-familial transmission. *Am. J. Gastroenterol.* 87(3): 382-386.
- Mobley, H. L. T. (2001). Ureasa. En: *Helicobacter pylori*: Physiology and genetics. (Eds. Mobley, H. L. T., Mendz, G. L. y Hazell, S. L.). ASM Press. USA, pp. 179-191.
- Molhar, A., Ley, C., Guarner, J., Herrera-Goepfert, R., Sanchez, L., Halperin, D. y Personnet, J. (2002). Alta frecuencia de lesiones precursoras de cáncer gástrico asociadas a *Helicobacter pylori* y respuesta al tratamiento, en Chiapas, México. *Gac. Med. Mex.* 138(5): 405-410.
- Monrroy-Ortíz y Castillo, P. (2000). Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos. Universidad Autónoma del estado de Morelos, México.
- Morales-Espinoza, M. (2000). Diversidad genética de vacA en cepas de *Helicobacter pylori* y su asociación con la vacuolización en las células HeLa. Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Fac. de Medicina UNAM, p. 85.
- Morris, A. J. y Nicholson, G. I. (1987). Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. *Am. J. Gastroenterol.* 82(3): 192-199.
- Morris, A. J., Ali, M. R., Nicholson, G. I., Perez-Perez, G. y Blazer, M. J. (1991). Long-term follow-up of voluntary ingestion of *Helicobacter pylori*. *Ann. Intern. Med.* 114(8): 662-663.
- Morris, B. L., Terry, L. T., Jun-Ling, Ma., Yun-Sheng, Chang., Wei-Cheng, You., Weng-Dong, Liu., Zhang, L. y Mitchell, H. G. (2001). *Helicobacter pylori* infection in rural China: exposure to domestic animals during childhood and adulthood. *Scand. J. Infect. Dis.* 33(9):686-691.
- Morris, B. L., Terry, L. T., Jun-Ling, Ma., Yun-Sheng, Chang., Wei-Cheng, You., Weng-Dong, Liu., Zhang, L., Pee, D. y Mitchell, H. G. (2002). *Helicobacter pylori* infection in rural China: demographic, lifestyle and environmental factors. *Int. J. Epidemiol.* 31(3):638-645.
- Navarrete, A. (1982). Estudio químico y pruebas farmacológicas preliminares de la corteza *Juliana adstringens* (Cuachalalate). Tesis profesional. Químico Farmacéutico Biólogo. ENEP Zaragoza, UNAM.
- Navarrete, A. (1986). Estudio químico de plantas mexicanas usadas en medicina tradicional: constituyentes de *Chenopodium graveolens* Willd, *Chenopodium ambrosioides* L. y *Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht. Tesis de

maestría en Ciencias Químicas (Química Farmacéutica). Facultad de Química, UNAM.

- Navarrete, A., Martínez-Urbe, L. y Reyes, B. (1998). Gastroprotective activity of the stem bark of *Amphipterygium adstringens* in rats. *Phytotherapy Research*. 12(1): 1-4.
- Navarrete, A., Mata, R. y Delgado, G. (1989). Alkyl anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. *Plant. Med.* pp. 55, 579.
- NIH (1994). Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH Consensus Development Panel on *Helicobacter pylori* in Peptic Ulcer Disease. *Jama*. 272(1): 65-69.
- O'Rourke, J. y Bode, G. (2001). Morphology and Ultrastructure. En: *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics. (Eds. Mobley H. L. T., Mendz G. L. y Hazell S. L.). ASM Press Washington, pp. 53-67.
- Ogura, B. K., Maeda, S., Nakao, M., Watanabe, T., Tada, M., Kyutoku, T., Yoshida, H., Shiratori, Y. y Omata, M. (2000). Virulence Factors of *Helicobacter pylori* Responsible for Gastric Diseases in Mongolian Gerbil. *J. Exp. Med.* 192(11): 1601-1609.
- Olivera, O. A. G., Soto, H. M, Martínez, V. M., Terrazas, S. T. y Solares, A. F. (1999). Phytochemical study of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*, Schiede ex Schlecht). *J. Ethnopharmacol.* 68(1-3): 109-113.
- OMS (Organización Mundial de la Salud) 2004. nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales. ARP-Sociedad para el avance del pensamiento crítico.
- Ortiz, S. A. (1988). Enlistado de Plantas Medicinales de Xoxocotla. IMMTTAC. *Med. Alternativa*. No. 4. México, pp. 166-223.
- Ortiz, S. A. (2004). Boletín de la Academia General de Biología. Cuachalalate, Número 10 y 11, Junio - Julio de 2004, CEAMISH – UAEM, Cuernavaca, Morelos, México.
- Oviedo-Chávez, I., Ramírez-Apan, T., Soto-Hernández, M. y Martínez-Vázquez, M. (2004). Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity. *Phytomed.* 11(5): 436-445.
- Patocka, J. (2003). Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. *J. Appl. Biomed.* 1(1): 7-12.
- Pearson, A. D., Ireland, A., Bamforth, J., Walker, C., Booth, L., Hawtin, P., Holdstock, G. y Millward-Sadler, H. (1984). Polyacrylamide gel electrophoresis of spiral bacteria from the gastric antrum. *Lancet*. 1(8390): 1349-1350.
- Pennington, T. y Sarukhán, J. (1998). Manual para la identificación de campo de los principales árboles tropicales de México, 2nd edn. INIF-SAG, FAO, pp. 413.
- Pérez-Pérez, G., Rothenbacher, D. y Brenner, H. (2004). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 9(1): 1-6.
- Pounder, R. E. y Ng, D. (1995). The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 9(2):33-39.

- Raedsch, R., Pohl, S., Plachky, J., Stiehl, A. y Kommerell, B. (1989). The growth of *Campylobacter pylori* is inhibited by intragastric bile acids. En: *Gastrointestinal Pathology and Campylobacter pylori*. (Eds. Megraud, F. y Lamouliatte, H.) Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. Pág. 409–412.
- Ramos, R. R., Alarcón-Aguilar, F., Lara-Lemus, A., y Flores-Saenz, J. L. (1992a). Hypoglycemic effect of plants used in México as antidiabetics. *Arch. Med. Res.* 23(1): 59-64.
- Ramos, R., Lara-Lemus, A., Alarcón-Aguilar, F. y Flores-Saenz, J. L. (1992b). Hypoglycemic activity of some antidiabetic plants. *Autumm.* 23(3): 105-109.
- Resenos, F. (2003). Valoración del efecto cicatrizante del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*). Subprograma 127 "Formación básica en Investigación" de la Facultad de Química, UNAM.
- Rivero-Cruz, I., Acevedo, L., Guerrero, J. A., Martínez, S., Bye, R., Pereda-Miranda, R., Franzblau, S., Timmermann, B. M. y Mata, R. (2005). Antimycobacterial agents from selected Mexican medicinal plants. *J. Pharmacy and Pharmacol.* 57(9): 1117-1126.
- Rodríguez-López, V., Salazar, L. y Estrada, S. (2003). Spasmolytic activity of several extracts obtained from some Mexican medicinal plants. *Fitoterapia.* 74(7-8): 725-728.
- Rodríguez-López, V., Aguirre-Crespo, F., Salazar L. y Estrada-Soto, S. (2006). Identification of fatty acid esters and hydrocarbon derivatives from *Cyrtocarpa procera* Kunth by GC-MS. *Natural Product Research.* 20(1):1-7.
- Rojas, A. M. (1986). Lista de plantas de Coatepec. IMMTTAC. *Med. Alternativa.* No. 2. México, pp. 79-80, 92-95.
- Rojas, A. M. (2001). Cuachalalate. *Tlahui Medic.* 11(I). Disponible en <http://www.tlahui.com/medic/medic11/cuachal1.htm>
- Romaniuk, P. J., Zoltowska, B., Trus, T. J., Lane, D. J., Olsen, G. J., Pace, N. R. y Stahl, D. A. (1987). *Campylobacter pylori*, the Spiral Bacterium Associated with Human Gastritis, Is Not a True *Campylobacter* sp. *J. Bacteriol.* 169(5): 2137-2141.
- Rosas, A. H., Soto, H. M., Martínez, V. M. y Terrazas, S. T. (2001). Fitoquímica de *Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht y *Cyrtocarpa procera* H. B. K. Resumen del XV Congreso Mexicano de Botánica, Fitoquímica.
- Rothery, G. y Day, D. (1985). Intestinal metaplasia in endoscopic biopsy specimens of gastric mucosa. *J. Clin. Pathol.* 38(6): 613-621.
- Rugge, M., Farinati, F., Baffa, R., Sonogo, F., Di Mario, F., Leandro, G. y Valiante, F. (1994). Gastric epithelial dysplasia in the natural history of gastric cancer: a multicenter prospective follow-up study. Interdisciplinary Group on Gastric Epithelial Dysplasia. *Gastroenterol.* 107(5): 1288-1296.
- Rugge, M., Leandro, G., Farinati, F., Di Mario, F., Sonogo, F., Cassaro, M., Guido, M. y Ninfo, V. (1995). Gastric epithelial dysplasia. How clinicopathologic background relates to management. *Cancer* 76(3): 376-382.
- Rzedowski, J. (1978). Vegetación de México. Limusa, México.

- Smoot, D. T., Resau, J. H., Naab, T., Desbordes, B. C., William, T., Bull-Henry, K., Curry, S. B., Nidiry, J., Sewchand, J., Mills-Robertson, K., Frontin, K., Abebe, E., Dillon, M., Chippendale, G. R., Phelps, P. C., Scout, V. F. y Mobley, H. L. T. (1993). Adherence of *Helicobacter pylori* to Cultured Human Gastric Epithelial Cells. *Infect. Immun.* 61(1): 350-355.
- Sobrino-Cossio, S., Rivera-Ramos, J. F., Ayala-Aguilar, G., Bosques-Padilla, F., Esquivel-Ayanegui, F., Herrera-Goepfert, R., Moreno-Terrones, L., Rodríguez-Magallán, A. y Torres-López, J. (2007). Epidemiología y Fisiopatogenia. III Consenso Mexicano sobre *Helicobacter pylori*. *Rev Gastroenterol. Mex.* 72(3):137-153.
- Solares, F. y Gálvez, C. M. C. (2001). Cuachalalate: Un recurso forestal sustentable de la selva baja caducifolia de México. Resumen del XV Congreso Mexicano de Botánica, conservación y Manejo de recursos. Querétaro del 14-19 de noviembre del 2001.
- Solnick, J. y Schauer, D. (2001). Emergente of diverse *Helicobacter pylori* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:59-57.
- Soriano-García, M., Toscazo, R. A., Ortiz, B., Navarrete, A., Sánchez-Obregón, R., Barrios, H. y Yuste, F. (1987). Structure and stereochemistry of the methyl ester of (5 α , 13 α , 14 β , 17 α , 20S, 24Z)-3-oxolanosta-7,24-dien-26-oic acid (masticadienonic acid). *Acta cryst.* C43(5):990-992.
- Soto, J. (1987). Las plantas medicinales y su uso tradicional en la cuenca del río Balsas: estados de Michoacán y Guerrero, México. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias UNAM, México.
- Spigelhalter, C., Gerstenecker, B., Kersten, A., Schiltz, E. y Kist, M. (1993). Purification of *Helicobacter pylori* Superoxide Dismutase and Cloning and Sequencing of the Gene. *Infect. Immun.* 61(12): 5315-5325.
- Stevens, W., Ulloa, U., Pool, A. y Montiel, O. (2001). Flora de Nicaragua. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. 85: 1-2666.
- Testerman, T. L., McGee, D. J. y Mobley, H. L. T. (2001). Adherence and Colonization. En: *Helicobacter pylori*. Physiology and genetics. (Eds. Mobley, H. L. T., Mendz, G. L. y Hazell, S. L.). ASM Press Washington, pp. 381-417.
- Torres, J., Leal-Herrera, Y., Pérez-Pérez, G., Gomez, A., Camorlinga-Ponce, M., Cedillo-Rivera, R., Tapia-Conyer, R., Muñoz, O. (1998). A Community-Based Seroepidemiologic Study of *Helicobacter pylori* Infection in Mexico. *J. Infect. Dis.* 178(4): 1089-1094.
- Torres, J., López, L., Lazcano, E., Camorlinga, P. M., Flores, L. y Muñoz, O. (2005). Trends in *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in Mexico. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 14(8): 1874-1877.
- Totten, P. A., Fennell, C. L., Tenover, F. C., Wezenberg, J. M., Perine, P. L., Stamm, W. E. y Holmes, K. K. (1985). *Campylobacter cinaedi* (sp. nov.) and

Campylobacter fennelliae (sp. nov.): two new *Campylobacter* species associated with enteric disease in homosexual men. *J. Infect. Dis.* 151(1): 131-139.

- Valle, J., Kekki, M., Sipponen, P., Ihamäki, T. y Siurala, M. (1996). Long-term course and consequences of *Helicobacter pylori* gastritis. Results of a 32-year follow-up study. *Scand. J. Gastroenterol.* 31(6): 546-550.
- Varoli, O., Landini, M. P., LaPlaca, M., Tucci, A., Corinaldesi, R., Paparo, G. F., Stanghellini, V. y Barbara, L. (1991). Presence of *Helicobacter pylori* in gastric juice. *Am. J. Gastroenterol.* 86(2): 249.
- Warren, J. R. y Marshall, B. J. (1983). Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet.* 1(8336): 1273-1275.
- Zamora-Tirado, P. E. (2003). Evaluación del aprovechamiento potencial del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht) en San Juan Bautista Jayacatlán, Oaxaca. Tesis Profesional, UNAM, pp. 5, 9, 11, 14-16, 23-25, 34, 42.
- Zamudio-Lara, A. (2005). Estudio Hemero-bibliográfico del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) en forma de fitofármaco. Tesis profesional, Q. F. B. FES-Cuautitlán, UNAM, p. 90.
- Todas las páginas de la red fueron consultadas en 2008.

ANEXO 1

El método de “raspado de placa cromatográfica”, es una técnica que nos permite separar y aislar los compuestos de una planta a partir de una CCF. Una vez aislados los compuestos de las placas, es posible realizar la prueba biológica que se desee. En éste estudio al contar con las muestras de referencia del cuachalalate rojo también nos permitió conocer cual de estos compuestos se encontraba presentes en las dos cortezas analizadas.

La implementación de la misma en el laboratorio nos ha facilitado la identificación de compuestos anti-*H. pylori*, no obstante, no se habían realizado ensayos para conocer los límites de resolución así como la posible pérdida de actividad por parte de algunos compuestos a consecuencia de la metodología empleada.

Por estas razones se realizaron los siguientes ensayos en los cuales se corrieron varias concentraciones de muestras de referencia (metronidazol, amoxicilina, ácidos anacárdicos y el ácido masticadienónico) en CCF, se aislaron por el “método de raspado” (Método 3.5.1) y el material recuperado se utilizó para medir la actividad anti-*H. pylori in vitro*.

El primer paso fue hacer soluciones concentradas o madre de cada muestra:

- Metronidazol: 30 mg/ml de metanol
- Amoxicilina: 3.0 mg/ ml de metanol
- Ácidos anacárdicos: 30 mg/ ml de acetato de etilo
- Ácido masticadienónico: 15 mg/ ml de acetato de etilo.

A partir de las soluciones madre se realizaron diluciones (1:2) y se cargaron en placas cromatográficas a las concentraciones finales escogidas (600, 300, 150, 75, 37.5, 18.75 y 9.37 µg/ml). Las placas se hicieron por cuadruplicado y se utilizaron diferentes polaridades para cada muestra con el objeto de lograr el mejor corrimiento de cada una de ellas: metronidazol (acetato de etilo-metanol 9/1); amoxicilina

(metanol-acetato de etilo 6/4); ácidos anacárdicos (acetato de etilo-hexano 6/4) y ácido masticadienónico (acetato de etilo-metanol 6/4).

Las placas se revelaron con luz UV a 365 nm, 254 nm y con vainillina. Se observó el patrón cromatográfico de las placas y se marcaron para aislar los compuestos individualmente, por el método de “raspado de placas cromatográficas”. El material recuperado se utilizó para medir la actividad anti-*H. pylori in vitro* con el método de cultivo en líquido.

CCF de las muestras de referencia

Metronidazol

El patrón cromatográfico del metronidazol a diferentes concentraciones aparecen en forma de ovalo y es fácilmente detectable con luz UV a 254 y 365 nm. En la Fig 27 a, b y c, están representadas las condiciones en que se corrieron cada placa cromatográfica. En el caso del revelado con vainillina no es muy clara la observación del compuesto pues se ven muy tenues las “bandas”.



Fig. 27a. CCF del antibiótico metronidazol a diferentes concentraciones. La placa cromatográfica fue corrida con acetato de etilo-metanol (9/1) y estimulada a 365 nm.

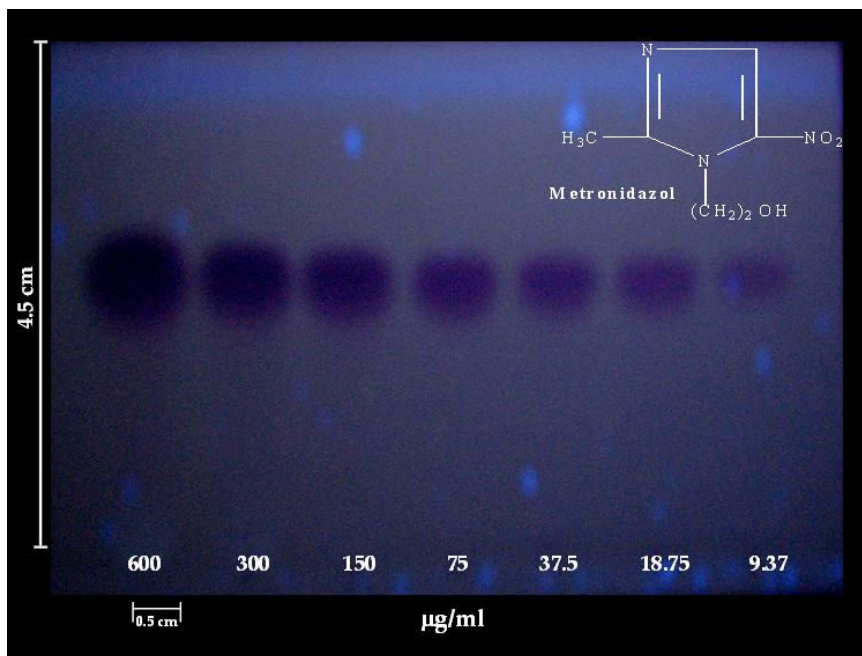


Fig. 27b. CCF del antibiótico metronidazol a diferentes concentraciones. La placa cromatográfica fue corrida con acetato de etilo-metanol (9/1) y estimulada a 254 nm.

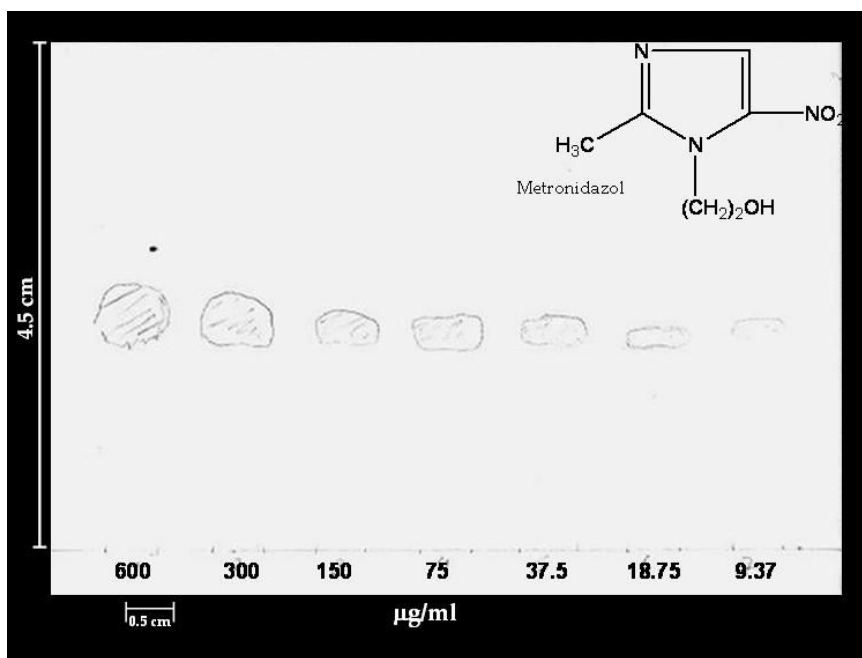


Fig. 27c. CCF del antibiótico metronidazol a diferentes concentraciones. La placa cromatográfica fue corrida con acetato de etilo-metanol (9/1) y revelada con vainillina. En esta placa los compuestos no son fácilmente observables, pero si se puede detectar su presencia.

Ácidos anacárdicos

Debido a su naturaleza ácida, el patrón cromatográfico aparece en forma de “cohete”. Bajo las tres formas de análisis es muy clara la presencia del compuesto (Fig. 28a-c).

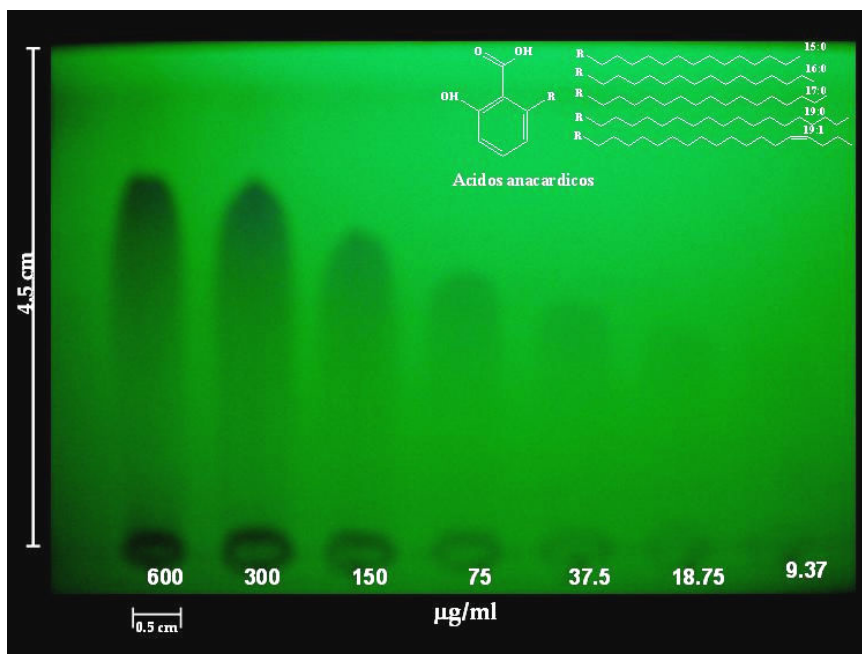


Fig. 28a. CCF de los ácidos anacárdicos. La placa cromatográfica fue corrida con hexano-acetato de etilo (6/4) y estimulada a 365 nm.

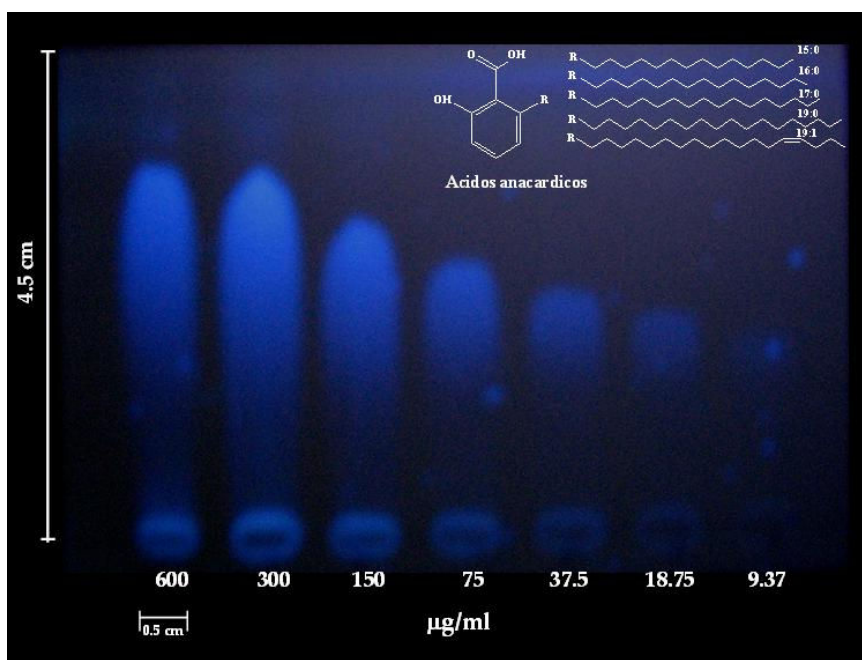


Fig. 28b. CCF de los ácidos anacárdicos. La placa cromatográfica fue corrida con hexano-acetato de etilo (6/4) y estimulada a 254 nm.

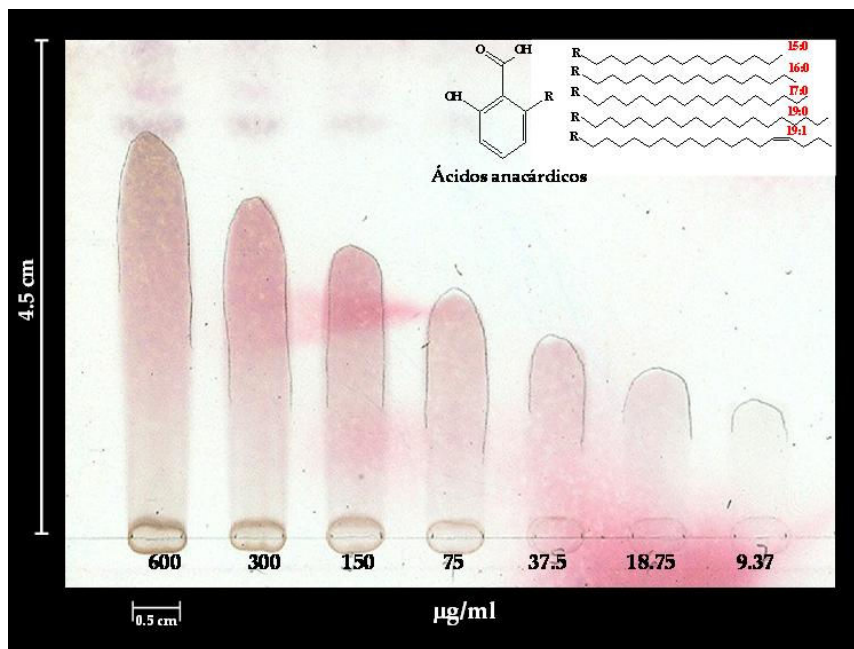


Fig. 28c. CCF de los ácidos anacárdicos. La placa cromatográfica fue corrida con hexano-acetato de etilo (6/4) y revelada con vainillina.

Amoxicilina

Para el caso de la amoxicilina su baja solubilidad no permite realizar las concentraciones mayores a 30 µg/ml, sin embargo, si se puede registrar incluso a concentraciones de 0.93 µg/ml al estimularse con luz UV de 365nm. No se puede observar la amoxicilina en luz UV a 254 nm, ni revelada con vainillina.

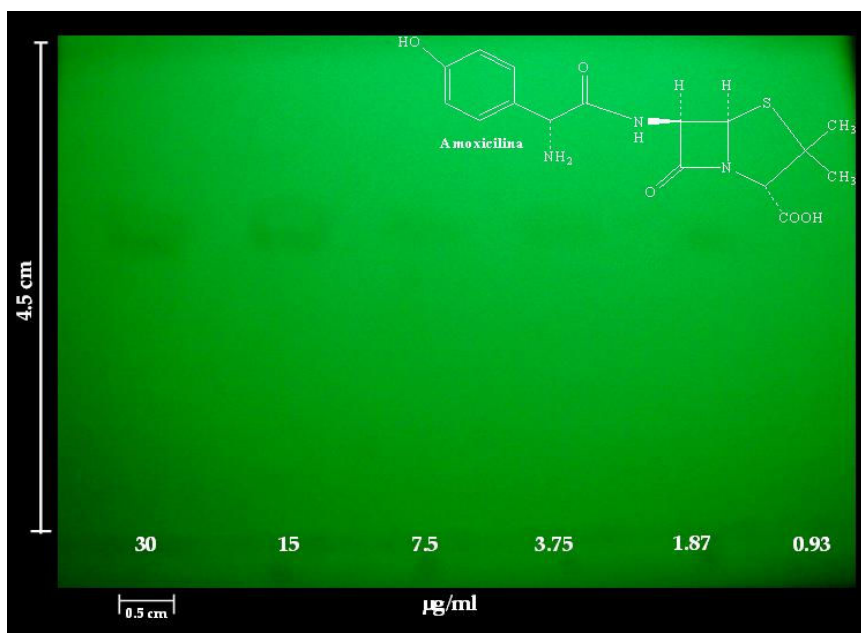


Fig. 29a. CCF del antibiótico amoxicilina. La placa cromatográfica fue corrida con metanol -acetato de etilo (6/4) y estimulada a 365 nm.

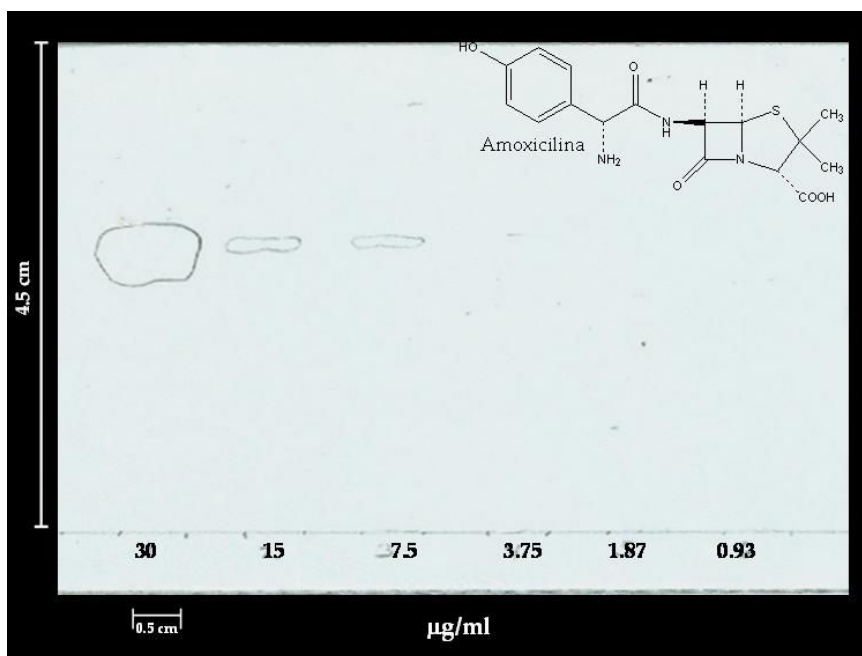


Fig. 29b. CCF del antibiótico amoxicilina. La placa cromatográfica fue corrida con metanol-acetato de etilo (6/4) y revelada con vainillina.

Ácido masticadienónico

Al igual que los ácidos anacárdicos este compuesto es observado en una placa cromatográfica en forma de “cohete”. Aunque el compuesto presenta una alta solubilidad, en la CCF solo se pudo analizar a una concentración máxima de 150 µg/ml por la saturación de la placa. El compuesto es observable perfectamente hasta una concentración de 9.37 µg/ml y no se pueden observar con luz UV a 254 nm.

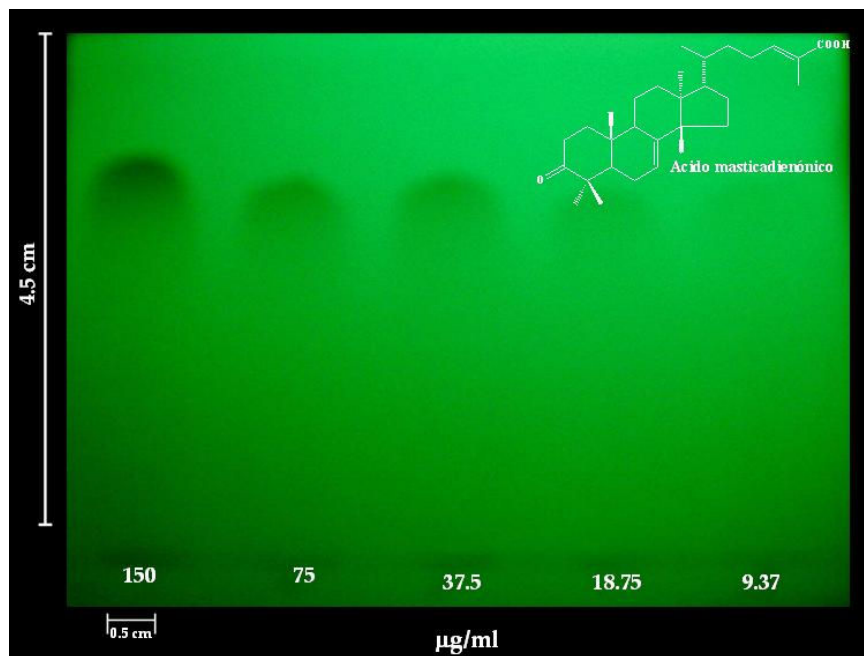


Fig. 30a. CCF del ácido masticadienónico. La placa cromatográfica fue corrida con acetato de etilo-metanol (6/4) y estimulada a 365 nm.

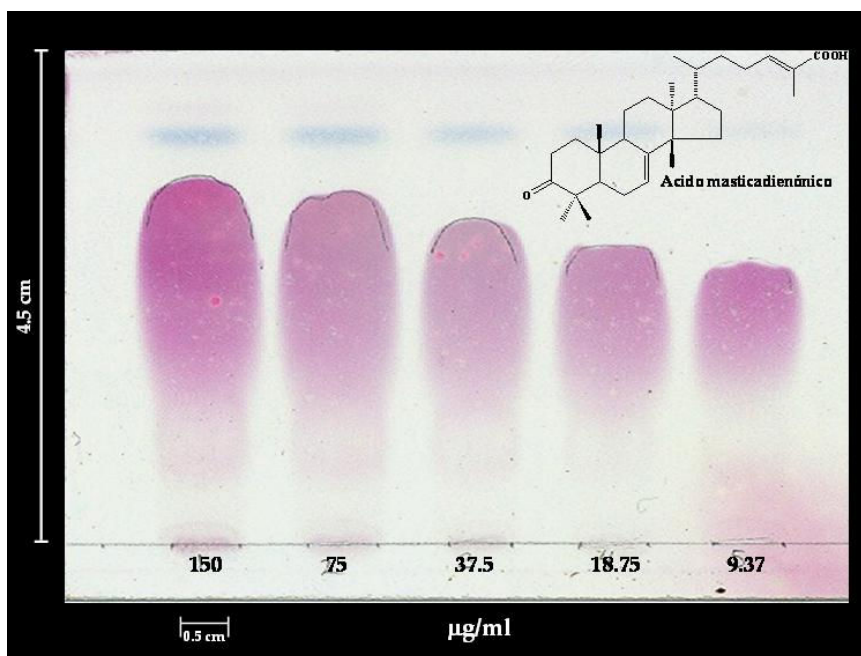


Fig. 30b. CCF del ácido masticadienónico. La placa cromatográfica fue corrida con acetato de etilo-metanol (6/4) y revelada con vainillina.

Determinación de la actividad anti-*H. pylori* in vitro de las muestras de referencia recuperadas de la CCF

Una vez que se corrieron las CCF de cada una de las muestras de referencia, se extrajeron los compuestos utilizando el método de raspado de placa (Método 5.5.1).

La actividad anti-*H. pylori* se determinó en cultivo líquido y se añadieron diferentes concentraciones de algunas muestras de referencia reportadas. Estas concentraciones se calcularon suponiendo que se había recuperado el 100% del material colocado en cada carril de la placa.

Las concentraciones finales utilizadas y los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 31. En la gráfica no se incluye a la amoxicilina debido a que no se obtuvo actividad inhibitoria. El ácido masticadienónico es un compuesto que no inhibe el crecimiento de la bacteria (Castillo *et al.*, 2007) y nuestros resultados están de acuerdo a esto, ya que los porcentajes de inhibición fueron muy bajos. Los ácidos anacárdicos inhiben a la bacteria con una CMI = 10 µg/ml, sin embargo en nuestro trabajo, a una concentración de 12 µg/ml encontramos solo un 5% y a 200 µg/ml del 67%. El metronidazol a 200 µg/ml inhibe el crecimiento entre un 80-95% y nuestros resultados nos dan una inhibición del 63%. En cuanto a la amoxicilina, hay que señalar que para este compuesto se reportan CMI menores a 0.1 mg/ml, de tal manera que la falta de actividad no se deberá a la concentración empleada en este trabajo, sino a la pérdida del compuesto por la metodología empleada, además se reporta que la amoxicilina es altamente sensible al calor.

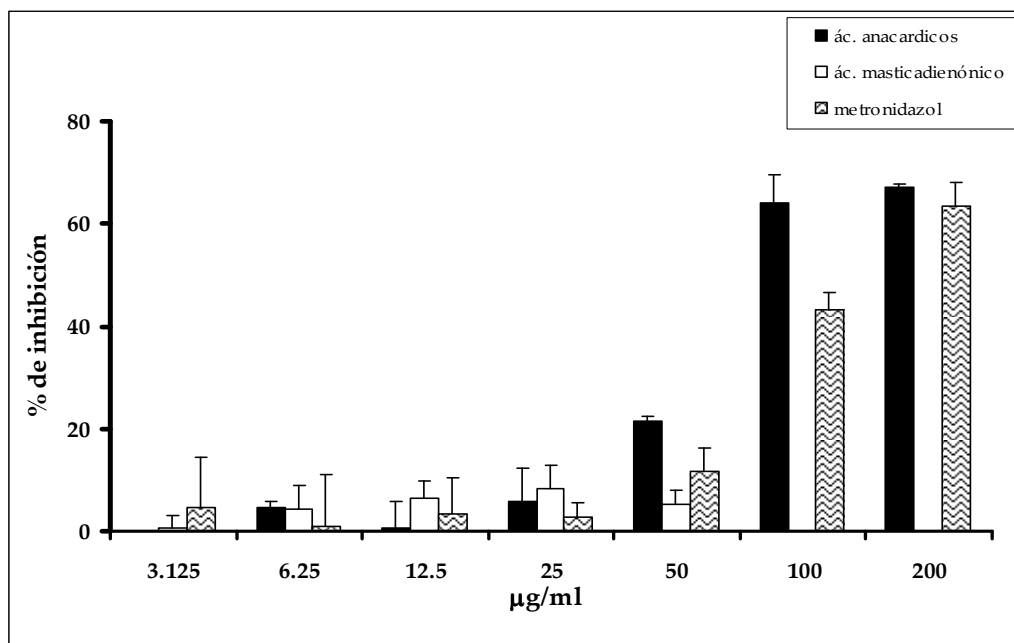


Fig. 31. Actividad anti-*H. pylori* de los compuestos de referencia recuperados de la CCF en las concentraciones finales. **Nota:** ya que cada concentración indicada en las placas se agrega a un cultivo de 3 ml, la concentración final es tres veces menor a la que se cargo inicialmente en la CCF.

En general, los resultados indican que la recuperación de compuestos por el método de raspado en placa se pierde una buena cantidad de compuesto y esto depende de la naturaleza química del compuesto y de su resistencia a la descomposición principalmente.

Sin embargo, representa un método que permite la identificación y ensayo de la actividad biológica de manera relativamente rápida y que emplea poca cantidad de compuesto.

Hay que hacer notar que no es un método cuantitativo ya que el patrón cromatográfico y la concentración de compuestos no están relacionados.