



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

EFFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE
Amphipterygium adstringens (Cuachalalate) EN
Helicobacter pylori, EVIDENCIADO POR EL MÉTODO
DE MOSMANN Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE
TRANSMISIÓN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

CLAUDIA MÓNICA CRUZ RAMÍREZ

ASESORES:

M.V.Z. GERARDO CRUZ JIMÉNEZ
M.V.Z. JOSÉ ANTONIO LICEA VEGA
M. en C. GERARDO GONZÁLEZ VALENCIA



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
 FACULTAD DE ESTUDIOS
 SUPERIORES CUAUTITLAN

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
 PRESENTE



DEPARTAMENTO DE

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis :

Efecto del extracto acuoso de Amphipterygium adstringens
(Cuachalalate) en Helicobacter pylori evidenciado por el
Método de Mosmann y Microscopía Electrónica de Transmisión

que presenta la pasante: Claudia Mónica Cruz Ramírez
 con número de cuenta: 40110881-9 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 06 de Octubre de 2008

PRESIDENTE MVz. Gerardo Cruz Jiménez

VOCAL MC. Sofía González Gallardo

SECRETARIO OPB. Brígida del C. Camacho Enriquez

PRIMER SUPLENTE Dra. Alma Lucila Núñez del Arco

SEGUNDO SUPLENTE MC. Marfa Guadalupe Aviles Robles

AGRADECIMIENTOS

Mi mamá Ma. del Rocío Ramírez Royaceli; por haberme apoyado en todo momento, por tus consejos, tus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por tu amor... Te Amo Mucho y Te admiro

Mi papá Jorge M. Cruz Salazar; por los ejemplos de perseverancia y constancia que te caracterizan y que me has enseñado siempre, por el valor que muestras para salir adelante y por tu amor... Te Amo Mucho

A mis hermanos Edgar y Humberto Cruz Ramírez; por que siempre he contado con ellos para todo, gracias a la confianza que siempre nos hemos tenido; por el apoyo y amistad.

M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez; por fomentar en mí el deseo del saber y su generosa dedicación ante las horas empleadas en la elaboración de este trabajo. Compartiendo su conocimiento y entendimiento, dándome ánimo en épocas de crisis. Gracias por su apoyo, amistad y comprensión frente a las dificultades acontecidas a lo largo de estos años; para usted mi admiración y cariño. Por su pasión a favor de la investigación y la enseñanza es un ejemplo de vida.

M.V.Z. José Antonio Licea Vega, por su valiosa colaboración en los ensayos, el ánimo, apoyo y los consejos recibidos.

M. en C. Gerardo González Valencia de la Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México.; por la gran ayuda otorgada, el apoyo y por su predisposición permanente en aclarar mis dudas.

Erika Castillo Soto (Eri) mi gran gran amiga, gracias por estar conmigo en las buenas y las malas por escucharme, por los consejos, los momentos divertidos, la confianza y el apoyo que me brindas; por tener unos niños maravillosos (Briyit, Britany y Jonathan). Me has enseñado que en la vida siempre es importante sonreír para ser feliz. Gracias por compartir conmigo tu amistad nunca olvides que en mi mente y corazón te voy a llevar, TE QUIERO MUCHO.

Rosita Martínez Canales gracias por tu increíble amistad, tu apoyo incondicional por las confidencias compartidas, por tu constante disponibilidad y buen humor; eres una GRAN AMIGA con la que puedo contar siempre. Te Quiero Mucho

Edith Maribel Prado Manjarrez, Gloria Isabel Rivero Ortiz, Tonanzin Hernández Cortes; MIS MEJORES AMIGAS, con quienes he compartido muchos momentos que siempre llevaré en mi corazón. Ustedes han enriquecido mi vida con su cariño y su alegría. Gracias por recordarme que hay personas valiosas en el mundo y gracias por estar en el mío. Las Quiero Mucho

Mario Alberto Aguilera Cruz mi súper mega amigo, tener tu amistad es un gran privilegio por que en las buenas y en las malas siempre estas aquí, gracias por todos tus consejos, por la confianza y más por esos momentos alegres que hemos y seguiremos pasando. Te Re - Quiero B.E

Marco Antonio Hernández Bedolla, por estar siempre conmigo apoyándome en todas las circunstancias posibles; gracias por ese regalo que me das: tu gran amistad sin igual, la cual se va enriqueciendo día a día. Te Quiero Mucho

Elvin J. J. Herrera Puentes, mi mejor amigo, mi hermano, que a través de los años y distancia nunca has dejado de brindarme tu amistad, tu lealtad, tu confianza, tu apoyo incondicional, gracias por compartir tantas aventuras y experiencias, por que hiciste que todo este camino fuera fácil y súper divertido. Te Quiero Muchísimo.

Sara Soto Maldonado; por tu apoyo, ánimo, cariño, por compartir conmigo muchos momentos tanto alegres como tristes, por tener siempre tendida tu mano amiga, por escucharme, en fin, por darme cariño y amistad .Te quiero mucho.

A Jessica Hernández Jiménez ☩ a pesar de que no estas aquí ahora en estos momentos conmigo, sé que tú alma si lo está y por que tuviste los mismos sueños que nosotros nunca te olvidaremos gracias amiga.

Javier Ramírez Villar, por brindarme tu ayuda y amistad desde el primer momento y siempre, por todos esos instantes divertidos. Gracias amiguito TQM

A ti Alejandro Iván Casasola Zamorategui; por que en tu compañía las cosas malas se convierten en buenas, la tristeza se transforma en alegría y la soledad no existe; por ser mi apoyo en todo momento, por tus palabras de aliento cuando más las necesitaba. Gracias por hacer de esos instantes un verdadero vivir.... Por todo tu amor. T.A.M.P.

Generación 28 Q.F.B.: Alejandro García Rivera☺, Juan Francisco Martínez Mendoza, Raúl Álvarez, Sergio Jiménez Mora, Polo Barbosa Ochoa, Coyolxaulqui Hernández Cortes, Gaby Gamez Mendoza, Erick Hernández Flores; Efraín, Néstor Mendoza, Oscar Villaseñor, Gaby Barron, Ramón, Mónica Hernández, por mencionar algunos; con quienes construimos conocimiento, compartimos mañanas, tardes y noches de estudio, momentos de nerviosismo en parciales y finales; gracias por su sincera amistad sin la cual no hubiera disfrutado tanto mi carrera.

Así como compañeros de la Facultad; Octavio Sánchez Pérez (Gen. 32), Karina Chávez, Toño Alarcón, Carlitos Nieto, Chio, Liz, José Luis, Martín Pacheco, Eve (Gen. 29). Dalis, Carmen Marduck, Zaida (Gen. 30), Freddy (Q.I y, Eduardo Merino (Gen. 32). Por su compañerismo y amistad.

Yazmín Canales Meza, Omar Morales Cervantes, Eduardo Orozco, Paty López, José de Jesús Rosales Bastida, Eddy Anaya, Victor Hugo Reyes López, Yilver Cortes, Pedro Martínez, Jesús Lechuga, Hisler, Hugo Cervantes Vega, Mauricio Ramírez Martínez, Oscar, Lalo Méndez, Mauricio (Morris), Daniel Salcedo González☺, Javier Dumaine Álvarez, Marcelo Sánchez López. Por su amistad incomparable...Gracias

A los profesores, María Elena, Susana, Eva López, Andrea, Mari Carmen y familia, de la E.S.T No.106., por todo su apoyo.

A mis tías y tíos, Patricia Ramírez Royaceli, Luz María Ramírez Royaceli, Jorge Zaragoza, Antonio Ramírez Royaceli, Sonia Gil. Gracias por todo su apoyo y cariño.

A mis primos y primas, Juan Carlos Ramírez Royaceli TQM; Israel, Rodrigo e Iván Zaragoza Ramírez, Gabriel y Angélica Castro Ramírez, Gaby, Sandra, Marco y Luis Ramírez Gil. Gracias por las experiencias divertidas que hemos compartido, el apoyo y el cariño que me han demostrado.

A mis sobrinos Ariel Ramírez Te Adoro Mi Niño, Diego Ramírez, Mayte, Ingrid, Kevin y Aaron Rodrigo. Los Quiero Mucho.

A mi adoración de abuelita, Concepción Royaceli por su cariño, consejos, pláticas y por que su simple existencia me alegra la vida... La Amo

A mi abuelito Trini ☩; aunque ya no estas con nosotros te seguimos recordando; por todo tu amor y cariño. ¿Quién es el que anda ahí?... Es Ki-Ki, abuelito... Te amo

A la familia Cruz Salazar, por su apoyo.

Al Laboratorio 10 de Microbiología de la Unidad de Posgrado: Sonia Hernández, Lupita Vera Amalia, Alejandro Cortés Juárez☺, Mara, Iyonne, Ulises Aguilar, Yola, Belem, Gaby, Vero; por su apoyo y por hacer que este tiempo fuera ameno.

A la M. en C. Sofía González Gallardo por la dirección y apoyo en la realización de la parte de Microscopía Electrónica de Transmisión en éste trabajo.

Al Sr. Martín y Edgar por todo el apoyo recibido para la realización de este trabajo.

Igualmente quiero expresar mi agradecimiento a mis sinodales: a Dra. Alma Lucila del Arco Núñez, M en C. Sofía González Gallardo, QFB. Brígida del Carmen Camacho Enríquez y M. en C. María Guadalupe Aviles Robles quienes me ofrecieron valiosos comentarios al revisar gentilmente mi manuscrito.

*Finalmente a la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme brindado no sólo una formación profesional y una educación de calidad; ya que todos somos seres con la misma capacidad de triunfar, la diferencia consiste en las oportunidades que se tienen en la vida...**Por mi raza hablará el espíritu.***



*Como no te voy a querer
como no te voy a querer si
mi corazón azul es,
y mi piel dorada
siempre te querré.*

DEDICATORIAS



*A mis queridos padres, son ustedes quienes verdaderamente son los dueños de este título, sin su apoyo no lo habría logrado, mil gracias por ser mis guías, y por ser para mí un ejemplo de trabajo, esfuerzo y dedicación.
LOS AMO MUCHO*

*No debe avergonzarnos el tomar del pueblo todo
aquello que pueda ser útil para el arte de curar.*

Hipócrates

INDICE GENERAL

Índice de Figuras	I
Índice de Tablas	II
Índice de Gráficos.....	III
Lista de Abreviaturas.....	IV
Resumen	1
1. Introducción	2
1.1 Aparato Digestivo	2
1.1.1. Digestión.....	3
1.1.2. Patologías	5
1.2. <i>Helicobacter pylori</i>	8
1.2.1. Antecedentes	8
1.2.2. Generalidades	9
1.2.3. Factores de Patogenicidad	10
1.2.4. Epidemiología.....	20
1.2.5. Factores de Riesgo	21
1.2.6. Transmisión	21
1.2.7. Diagnóstico.....	23
1.2.7.1. Métodos Directos	24
1.2.7.2. Métodos Indirectos	26
1.3. Antimicrobianos	27
1.3.1. Definición.....	28
1.3.2. Clasificación	29
1.3.3. Tipos de Agentes Antimicrobianos	31
1.3.4. Resistencia Bacteriana	32

1.3.5 Tratamiento de la infección por <i>Helicobacter pylori</i>	34
1.4. Medicina Tradicional	37
1.4.1. Herbolaria	39
1.4.2. Cuachalalate.....	41
1.5. Microscopia Electrónica de Transmisión	49
1.5.1 Tinción Negativa.....	50
1.6. Ensayo Colorimétrico de Mosmann	50
1.7. Dilución en Tubo	51
2. Hipótesis	52
3. Justificación	53
4. Objetivo General.....	54
4.1 Objetivos Particulares	54
5. Metodología	55
6. Diagrama de Trabajo.....	63
7. Resultados.....	64
8. Discusión	72
9. Conclusiones	79
10. Sugerencias.....	80
11. Anexo1.....	81

12. Anexo 2.....	84
13. Bibliografía.....	90

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aparato Digestivo.....	2
Figura 2. Úlcera Duodenal y Gástrica.....	6
Figura 3. Robin Warren y Barry Marshall.....	8
Figura 4. <i>Helicobacter pylori</i>	9
Figura 5. Reacción de la Urea	14
Figura 6. Formación de la úlcera	19
Figura 7. Prevalencia de la Infección por <i>H. pylori</i>	20
Figura 8. Jarra Gas Pack para anaerobiosis	25
Figura 9. Cuachalalate	41
Figura 10. Árbol de Cuachalalate.....	42
Figura 11. Principales Edos. de la Rep. Mexicana donde se usa el Cuachalalate.....	43
Figura 12. Corteza de Cuachalalate	45
Figura 13 Ácido masticadienónico	46
Figura 14. Ácido 3 α – hidroximasticadienónico	46
Figura 15. β -sitoesterol.....	47
Figura 16. Microscopio Electrónico de Transmisión.....	49
Figura 17. Método de Filtración	55
Figura 18. El manejo de la cepa de <i>H. pylori</i>	56
Figura 19. Método de Dilución en tubo	58
Figura 20. Microplaca, método de Mosmann	59
Figura 21. Rotulación y Resultados del efecto Bactericida - Bacteriostático	61
Figura 22. Resultado Bacteriostático	70
Figura 23. Microfotografía de <i>Helicobacter pylori</i>	71
Figura 24. Microfotografía de <i>Helicobacter pylori</i> tratada con Cuachalalate	71
Figura 25. Tinción de Gram.....	88
Figura 26. Prueba de Catalasa	88
Figura 27. Prueba de Oxidasa	89
Figura 28. Prueba Urea de Christensen	89

INDICE DE TABLAS

Tabla No.1 Componentes del Aparato Digestivo	2
Tabla No.2 Factores de Virulencia de <i>H. pylori</i>	11
Tabla No.3 Métodos de Diagnóstico.....	23
Tabla No.4 Esquemas de Tratamiento contra <i>H. pylori</i>	37
Tabla No.5 Usos y forma de preparación del Cuachalalate	44
Tabla No.6 Primer ensayo <i>H. pylori</i> versus Extracto de Cuachalalate	64
Tabla No.7 Segundo ensayo <i>H. pylori</i> versus Extracto de Cuachalalate	66
Tabla No.8 Tercer ensayo <i>H. pylori</i> versus Extracto de Cuachalalate	68
Tabla No.9 Resultados de Pruebas Bioquímicas	87

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Primer ensayo <i>H. pylori</i> versus Extracto de Cuachalalate	64
Gráfico 2. Representación en Barras del Primer Ensayo	65
Gráfico 3. Segundo ensayo <i>H. pylori</i> versus Extracto de Cuachalalate	66
Gráfico 4. Representación en Barras del Segundo Ensayo	67
Gráfico 5. Tercer ensayo <i>H. pylori</i> versus Extracto de Cuachalalate.....	68
Gráfico 6. Representación en Barras del Tercer Ensayo	69

ABREVIATURAS

AINEs	Antiinflamatorios No Esteroideos
Vac A	Vacuolating Cytotoxin-associated gene A (Citotoxina Vacuolizante asociada al gen A)
Cag A	Cytotoxin-associated gene A (Citotoxina asociada al gen A)
PMN	Polimorfonucleares
UBT	Urea Breath Test
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RBC	Ranitidina-Citrato de Bismuto
IPB	Inhibidor de la Bomba de Protones
OMS	Organización Mundial de la Salud
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
mL	mililitros
µm	micrómetro
µL	microlitros
gr.	gramos
mg.	miligramos
nm	nanómetros
°C	Grados Centígrados

RESUMEN

El uso de plantas medicinales con fines terapéuticos ha sido preservado en nuestra cultura durante siglos. Diversas especies vegetales en la actualidad son ampliamente utilizadas para tratar los problemas de salud que se presenten en determinado momento o simplemente tienen la función de prevenir. El objetivo de este trabajo es determinar el efecto inhibitorio del extracto acuoso de *Amphipterygium adstringens* en *Helicobacter pylori* que esta involucrada en patologías gástricas. En este proyecto se requirió de una capacitación en el manejo de ésta bacteria, se utilizó el Método de Mosmann y Microscopía Electrónica de Transmisión para dilucidar los resultados.

Se realizó la corroboración de la cepa de *Helicobacter pylori* 26695 mediante pruebas bioquímicas. El extracto se preparó calentando 100mL de agua destilada hasta ebullición, se colocaron 4.5gr. de *Amphipterygium adstringens* se retiró del fuego y se dejó reposar 10min., se prefiltro y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Después se paso por membranas de 5.0, 0.8, 0.45 μ m no estériles, en seguida se esterilizó la infusión por filtración con una membrana estéril de 0.22 μ m; posteriormente se efectuó una prueba de esterilidad haciendo un sembrado masivo en Agar BHI, teniendo un resultado negativo de crecimiento microbiano; se obtuvo una concentración de 4380 μ g/mL.

Para realizar los ensayos en microplaca se emplearon diluciones dobles y se aplico el Método de Mosmann ensayando la bacteria con el extracto de Cuachalalate para así evaluar la CMI.

Se determinó el efecto bactericida y/o bacteriostático mediante una prueba cualitativa, posteriormente se hicieron observaciones en el Microscopio Electrónico de Transmisión evidenciando el posible daño sobre la bacteria. El extracto acuoso de Cuachalalate presenta un efecto inhibitorio en *Helicobacter pylori* en todas las diluciones realizadas consiguiendo así una CMI de 34 μ g/mL. El efecto que causo *Amphipterygium adstringens* es bacteriostático y lo que observamos en Microscopía Electrónica de Transmisión es una alteración en pared celular de *Helicobacter pylori*.

1 INTRODUCCION

1.1 Aparato digestivo.

El aparato digestivo consta de órganos huecos que forman un largo tubo de aproximadamente 9 metros que comienza de la boca y termina en el ano. En su interior se encuentra una membrana llamada mucosa esta contiene glándulas que producen jugos que contribuyen a la digestión de los alimentos. [1]

APARATO DIGESTIVO

TUBO DIGESTIVO	GLÁNDULAS DIGESTIVAS
1. Boca	1. Glándulas Salivales
2. Faringe	2. Hígado
3. Esófago	3. Páncreas
4. Estomago	
5. Intestino Delgado	
6. Intestino Grueso	
7. Ano	

Tabla 1. Componentes del Aparato Digestivo

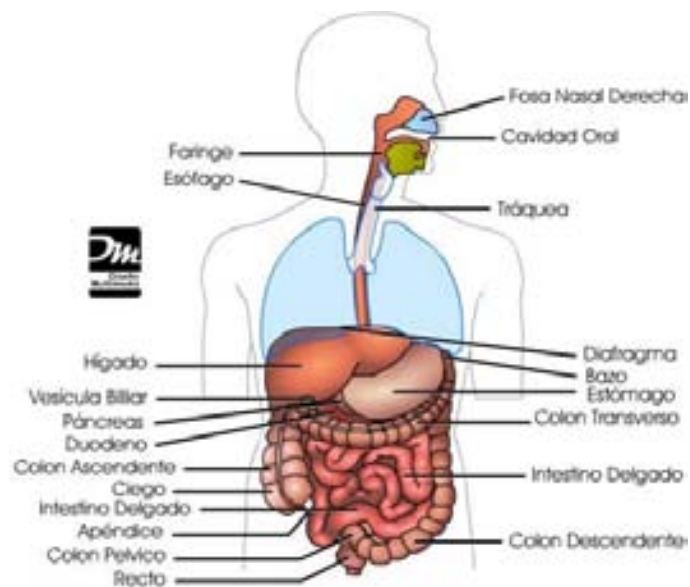


Fig. 1 Aparato Digestivo [2]

1.1.1 Digestión

La digestión comienza en la boca debido a que nuestras glándulas salivales que se encuentran debajo de la lengua y cerca de la mandíbula inferior producen saliva la cual contiene una serie de enzimas como la amilasa que comienza con la descomposición de algunos carbohidratos. El flujo de saliva se pone en movimiento por un reflejo del cerebro que se desencadena a través de impulsos nerviosos.

La deglución que se logra por movimientos musculares de la lengua y la boca desplazan los alimentos a la faringe siendo esta un pasaje para los alimentos y el aire mide 12.7cm. Una prolongación flexible de tejido, denominado epiglotis se cierra sobre la traquea cuando tragamos para impedir el ahogo.

Desde la garganta, los alimentos pasan por un tubo muscular localizado en el pecho denominado esófago. La peristalsis es un fenómeno de contracciones musculares con la cuales los alimentos se dirigen del esófago al estómago. Normalmente una persona no percibe los movimientos del esófago, estomago e intestino. En el extremo del esófago se encuentra un anillo muscular denominado esfínter inferior con el que los alimentos ingresan al estomago, cerrándose para impedir que se regresen los alimentos o los líquidos al esófago.

El músculo del estomago revuelve y mezcla los alimentos con ácidos y enzimas descomponiéndolos en trozos pequeños y digeribles. Las glándulas que revisten al estómago producen aproximadamente 2.8 Litros de jugo digestivo al día. Algunas sustancias como los azucares, el agua, la sal y el alcohol pueden ser absorbidas a través de la pared estomacal. La mayor parte de las sustancias en los alimentos necesitan de mayor digestión y deben pasar por el intestino antes de ser absorbidos. Cuando el estomago se encuentra vacío en un adulto tiene un volumen de un quinto de una taza pero puede extenderse para sostener mas de 8 tazas de alimentos después de cada comida.

Cuando los alimentos están listos para salir del estómago que ya han sido procesados en un liquido espeso denominado quimo, se mantienen en este por un tubo muscular del tamaño de una nuez que se encuentra en la salida del estómago llamado píloro hasta alcanzar la consistencia justa para pasar al intestino delgado.

El intestino delgado tiene tres secciones:

- Duodeno: la primera sección en forma de C
- Yeyuno: la sección media enrollada
- Ileon: la sección final que se comunica con el intestino grueso.

El quimo es lanzado al intestino delgado para que continúe la absorción de nutrientes en el torrente sanguíneo. La pared interna del intestino delgado está cubierta de millones de proyecciones microscópicas, en forma de dedos denominadas vellosidades siendo los vehículos a través del organismo puede absorber nutrientes.

El hígado el cual se ubica bajo la caja torácica en la parte superior de la derecha del abdomen, la vesícula biliar que se encuentra debajo del hígado y el páncreas ubicado debajo del estómago no son parte del tubo digestivo pero son órganos esenciales para la digestión, debido a que el páncreas produce enzimas que ayudan a digerir proteínas grasas y carbohidratos y una sustancia que neutraliza el ácido del estómago. El hígado produce bilis que ayuda al cuerpo a absorber grasas; ésta se encuentra almacenada en la vesícula biliar hasta su utilización. La bilis y enzimas son transportadas por conductos directamente al intestino delgado donde se lleva a cabo la descomposición de los alimentos. Otro papel del hígado es la manipulación y procesamiento de los nutrientes que son transportados por la sangre desde el intestino delgado al hígado.

Los alimentos que no fueron digeridos en el intestino delgado pasan al intestino grueso mediante un anillo muscular que impide que los alimentos se regresen denominado ciego. Cuando llegan al intestino grueso el trabajo de absorción de los nutrientes está casi terminado su principal función es eliminar el agua de la materia no digerida y formar los desechos sólidos que pueden ser excretados.

El apéndice es una bolsa pequeña hueca que cuelga en el extremo del ciego, la cual se cree que es parte de la evolución humana sin función alguna en el proceso de digestión. El colon se extiende desde el ciego y el cual tiene tres partes colon ascendente, descendente y recto sube por el lado derecho del abdomen conectándose con el recto, las bacterias del colon ayudan a digerir los restos alimentarios siendo en el recto donde se almacenan las heces hasta que salen a través del ano por movimientos intestinales (peristálticos).^[3]

1.1.2 PATOLOGÍAS

GASTRITIS

Es la inflamación del revestimiento interno del estómago. Puede ser causado por una infección bacteriana o viral, enfermedades del sistema autoinmune como el reumatismo o por el reflujo de bilis hacia el estómago (reflujo biliar). Así como por irritación originada por el consumo de alcohol, medicamentos (como la aspirina y los antiinflamatorios), vómito crónico, exceso de secreción (como el ocasionado por el estrés) y la ingestión de sustancias corrosivas o cáusticas (tóxicas).

Se puede presentar en forma súbita (gastritis aguda) o en forma gradual (gastritis crónica). La presencia de hipo, sensación de indigestión abdominal, pérdida de apetito, náuseas y vómitos (incluso sangre o con aspecto de granos de café) y evacuaciones oscuras son algunos de los síntomas. Algunas de las complicaciones más importantes se encuentra el sangrado que puede desencadenar la muerte; la pérdida de peso, anemia y problemas para tragar, por último se debe considerar que cuando el problema es crónico puede generar cáncer.

TRATAMIENTO

Según la causa; se usan medicamentos para disminuir la secreción de jugos gástricos como inhibidores de la bomba de protones. Cuando se relaciona con una infección deberán utilizarse antibióticos específicos. ^[4]

1.1.2.2 ÚLCERA PÉPTICA

Son lastimaduras en la mucosa interior del Estómago o en el Duodeno; éstas se producen cuando los jugos gástricos que contienen ácido clorhídrico y una enzima llamada Pepsina irritan y dañan el tejido. Las Úlceras Pépticas que se forman en la mucosa del Estómago son llamadas Úlceras Gástricas y las que se forman en el Duodeno son llamadas Úlceras Duodenales. Las causas mas comunes son por *Helicobacter pylori* y por AINEs (Antiinflamatorios No esteroideos). ^[5]



Fig. 2 Úlcera Duodenal y Gástrica ^[6]

CÁNCER GÁSTRICO

Es una enfermedad en la cual las células del estómago se vuelven malas (cancerosas) y crecen fuera de control formando tumores. La mayoría de los cánceres del estómago comienzan en el tejido glandular que forma el estómago. El tumor puede diseminarse por las paredes estomacales o pudiera cruzarlas para infiltrarse en el torrente sanguíneo o sistema linfático invadiendo otros órganos. Se puede clasificar de acuerdo con el tipo de tejido donde se originaron. Los más comunes son adenocarcinomas (comienzan en la cubierta glandular del estómago). Otras formas incluyen linfomas (sistema linfático) y sarcomas (tejido conectivo por ejemplo músculos, grasa o vasos sanguíneos). ^[7]

La causa exacta que origina el Cáncer estomacal es desconocida, pero la mayoría es el resultado de la exposición a los agentes cancerígenos, especialmente nitratos que encontramos en comidas preparadas (especialmente carnes) que están secas, ahumadas, saladas o en vinagre. Estos agentes causan que haya un error en el código genético que controla el crecimiento y la reparación de las células. Varias enfermedades están asociadas con el incremento en el riesgo del cáncer estomacal. Gastritis, anemia, pólipos gástricos, úlcera gástrica. *Helicobacter pylori*, una bacteria que infecta la mucosa del estómago causando inflamación crónica y úlceras, también incrementa el riesgo del cáncer estomacal. Además hay un riesgo ligeramente elevado del cáncer estomacal en personas que fuman o toman bebidas alcohólicas en exceso.

Personas que trabajan en ciertas industrias tienen mayor riesgo, incluyendo minería, refinación de níquel, industrias procesadoras de madera y plásticos, incluyendo a aquellas donde se trabaja con asbestos. [7]

SÍNTOMAS

Los pacientes que tienen cáncer estomacal en etapas tempranas tienen muy pocos síntomas. A veces indigestión y malestar estomacal, náuseas, pérdida de apetito, ardor. Las úlceras pépticas tienen síntomas similares y los antihistamínicos H₂ o los antiácidos pueden dar remedio temporal. Un tumor gástrico puede crecer mucho antes de causar síntomas. En casos avanzados los pacientes pueden sentir dolor o molestias en el abdomen, sangre en el excremento, vómitos con sangre, pérdida de peso, dolor después de comer y fatiga o mareos asociados con anemia. [7]

1.2 *Helicobacter pylori*

1.2.1 ANTECEDENTES

El patólogo Robin Warren a principios de junio de 1979, observó por primera vez a *Helicobacter pylori* en una biopsia gástrica proveniente de un paciente con gastritis crónica activa. Sus observaciones en estudios histopatológicas, continuaron por un par de años, asociando la presencia del microorganismo con esta patología. Durante este tiempo, hubo muchos intentos de aislar a la bacteria pero sin ningún éxito. En 1981, un médico gastroenterólogo, (Barry Marshall) se une a la investigación realizada por Warren y confirma lo reportado por éste último. La bacteria morfológicamente se parecía a un *Campylobacter* spp. razón por la cuál fue llamada *Campylobacter pyloridis*, y por tanto



FIG. No.3 ROBIN WARREN Y BARRY MARSHALL [8]

se emplearon los medios específicos de *Campylobacter* y las condiciones de su crecimiento para aislar a la bacteria de biopsias gástricas bajo las condiciones de crecimiento para *Campylobacter* spp. Sin embargo fue hasta 1982, que *H. pylori* fue aislado por primera vez y como suceso anecdótico, esto sucedió después de dejar el cultivo por más de 5 días gracias

a que hubo un día de asueto, que prolongo el fin de semana, dando el tiempo necesario para permitir el crecimiento bacteriano adecuado. Finalmente fue en 1984, que se publicó en la revista Lancet la asociación de *H. pylori* con la gastritis crónica y por primera vez se sugirió que la úlcera péptica pudiera ser de etiología infecciosa^[9]. En 1994 se efectuó una conferencia consensus por los Institutos Nacionales de Salud, donde *H. pylori* es declarado la principal causa de úlcera péptica y es en éste mismo año que la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer de la Organización Mundial de la Salud, declara que *H. pylori* es un cancerígeno en humanos.^[10]

1.2.2. GENERALIDADES

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa en forma helicoidal de S o bastón curvado de 0.5 – 1.0µm de ancho por 2.5 – 5.0µm de largo, microaerofílica. Su morfología colonial y microscopía varía de acuerdo a las condiciones del medio de cultivo. Por ejemplo en cultivos viejos presenta formas cocoides. Sin embargo puede observarse también en forma de V, de forma de U y en línea recta.^[11] Presenta

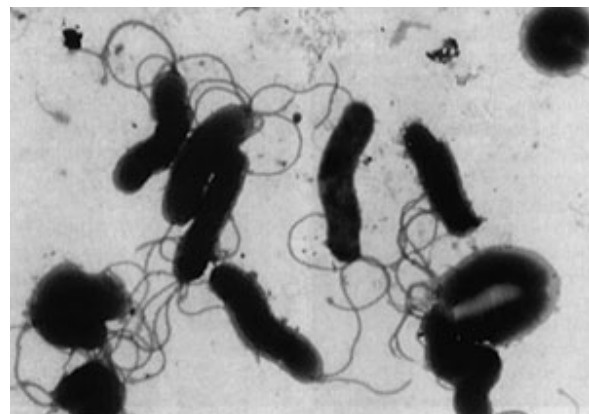


Fig. 4 *Helicobacter pylori* [13]

de 4 a 6 flagelos unipolares o bipolares recubiertos por una vaina y ensanchados en su extremo distal de diámetros 30µm de largo y 2.5nm de grueso aproximadamente^[10,12]. Toma de 5 a 7 días para poder apreciar las colonias en medios sólidos, y para su crecimiento en el laboratorio se requiere de condiciones de microaerofilia (O₂ 5%, CO₂ 10% y N₂ 85%) y medios artificiales ricos en nutrientes como: peptona, triptona, extracto de levadura, glucosa, y sales como cloruro de sodio y bisulfito de sodio suplementados con 5 a 10% sangre de caballo o carnero, polienriquecimiento, suero fetal bovino (SFB) o ambos. Las colonias son pequeñas circulares, convexas, húmedas y translúcidas de 2mm de diámetro, alrededor de las cuales se presenta una ligera hemólisis de color gris en Agar Sangre^[14].

Produce enzimas como oxidasa, catalasa y ureasa. La hidrólisis de la urea mediante la acción de la enzima ureasa produce amonio, el cual se ha propuesto que neutraliza el ácido clorhídrico del estómago y puede dañar directamente a las células epiteliales gástricas.^[15]

No produce Indol, H₂S, reduce nitratos a nitritos, fermenta la glucosa e hidroliza el hipurato^[16].

Se han determinado por lo menos 2 genes que codifican proteínas responsables de la virulencia de este germen: el VacA y el CagA. Existen dos grupos fenotípicamente distintos de *Helicobacter pylori*:

- Las bacterias de Tipo I: Expresan el gen asociado con la citotoxina (CagA, del inglés cytotoxin-associated gene) y el gen asociado con la citotoxina vacuolizante (VacA, del inglés vacuolating cytotoxin-associated gene); las cepas de Tipo I productoras de citotoxina y de la proteína asociada a la misma son predominantes en pacientes con úlcera y con cáncer. Las cepas de Tipo I resultan ser más patógenas que las de Tipo II e inducen una respuesta inflamatoria mas intensa.
- Las bacterias de Tipo II: No expresan estos dos genes. Las cepas de tipo II no son productoras de citotoxina y son capaces de producir lesión inflamatoria persistente^[17].

La bacteria es sensible *in vitro* a la penicilina, ampicilina, amoxicilina, eritromicina, gentamicina, kanamicina, metronidazol y tetraciclina. También es sensible a las sales de bismuto y se ha argumentado la resistencia a la vancomicina, sulfonamidas y el ácido nalidíxico^[18].

1.2.3 FACTORES DE PATOGENICIDAD

Múltiples factores participan en la inflamación gástrica, la alteración de la producción de ácido gástrico y la destrucción tisular que son característicos de la enfermedad por *H. pylori*.

Factores de Virulencia	Función
<i>Colonización</i>	
* Flagelo	Activa los movimientos por mucina
* Ureasa	Neutralización del ácido
* Adhesinas	Unión de <i>H. pylori</i> en el epitelio
<i>Daño Tisular</i>	
* Enzimas proteolíticas	La Glucosulfatasa degrada la mucina
* Citotoxina (CagA) 120kDa	Relacionada con la úlcera y gastritis severa
* Citotoxina de Vacuolización (VacA)	Daño al epitelio
* Ureasa	Efecto tóxico en las células epiteliales
* Fosfolipasa A	Digiere los fosfolípidos en las membranas de las células
* Alcohol dehidrogenasa	Lesión de la mucosa gástrica
<i>Supervivencia</i>	
* Vigilancia Intracelular	Previene la muerte en los fagocitos
* Superóxido dismutasa	Previene la fagocitosis y la muerte
* Catalasa	Previene la fagocitosis y la muerte
* Formas coloides	Forma inactiva
* Proteínas de shock de calor Ureasa	Antígenos de la membrana
<i>Otros</i>	
* Lipopolisacárido	Actividad biológica baja
* Homología del grupo sanguíneo de Lewis X/Y	Autoinmunidad

Tabla 2. Factores de virulencia de *H. pylori*^[19]

ESTRUCTURA ESPIRAL

La propia estructura de la bacteria le permite introducirse a través de la capa del moco gástrico actuando de forma similar a un sacacorchos y favoreciendo el acercamiento a las células epiteliales gástricas.^[17]

MOTILIDAD

Esta dada por 2 o 6 flagelos polares cubiertos, cuyo filamento consta de 2 tipos de flagelinas codificadas por dos genes FlaA y FlaB. Se ha demostrado que el gen FlaA es esencial para la movilidad; las envolturas de los flagelos son membranas que contienen proteínas y lipopolisacáridos sugiriendo que el papel de la cubierta es el de proteger el filamento del flagelo y promover la adhesión.^[20]

ADHESINAS

La adhesina, codificada por el gen *babA2*, favorece una unión persistente entre el microorganismo y la célula epitelial gástrica por unión de la célula bacteriana a través de su proteína BabA2 con antígeno de grupo Lewis B (Le^B), presente en la mucosa gástrica. Por lo tanto, cepas de *H. pylori babA2* positivas presentan mayor capacidad de adherencia, en cambio, las cepas *babA2* negativas se adhieren débilmente ^[21]. Esta adherencia se ha asociado con altos niveles de infiltración linfocitaria, atrofia glandular, metaplasia intestinal e incremento de la proliferación epitelial, reportándose una asociación significativa con úlcera duodenal y cáncer gástrico ^[22]. De acuerdo a Yu y col (2002), el gen *babA2* podría ser un marcador molecular útil para identificar pacientes con mayor riesgo de presentar patologías severas asociadas a infecciones por *H. pylori* ^[23].

Alves Oliveira y col (2003), en un estudio en Brasil, informaron una fuerte asociación entre *babA2* y la presencia de úlcera péptica o carcinoma gástrico ^[24].

CITOTOXINA VACUOLIZANTE (VacA)

Las cepas citotóxicas secretan una proteína que induce la formación de vacuolas en células eucarióticas. Aunque VacA esta presente en la mayoría de las cepas de *H. pylori* solo un 50% de las cepas expresan la citotoxina, las cuales se asocian a cuadros más graves de enfermedad. Las vesículas se originan por invaginación de la membrana para formar endosomas, los cuales se fusionan con lisosomas o con el Aparato de Golgi. El objetivo de VacA es la ATPasa de tipoV que está presente en los últimos endosomas. Una vez que ha reaccionado con su objetivo, la bomba de protones de hidrogeno es estimulada por la toxina y crea un ambiente ácido dentro de las vacuolas y sustancias ambientales básicas, como el amoníaco que cruza las membranas y son protonadas en el pH ácido. Las vacuolas originadas en el área perinuclear, se incrementan en número y tamaño; se fusionan unas con otras, la membrana celular se rompe y las células mueren. La vacuolización de las células inducida por el gen VacA es potencializada por la exposición de la citotoxina a pH bajo.

La inducción de la activación toma lugar a un pH de 5.5; a valores de pH “normales” del estomago (alrededor de pH: 2) el proceso de activación se lleva a cabo en segundos. Una vez ácido-activada, VacA retiene su actividad a pH neutro y se vuelve resistente ante el ataque de la pepsina. La inhibición de secreción ácida de los inhibidores de la bomba de protones (PPIs; Proton Pump Inhibitors) en el tratamiento de la úlcera péptica previene la ácido-activación de la toxina. Los inhibidores de la bomba de protones, también interfieren con la ATPasa de tipo vacuolar, que es el objetivo de VacA y en consecuencia inhibe la vacuolización. Las cepas de *H. pylori* activan los linfocitos polimorfonucleares (PMN) y obtienen una explosión oxidativa. Los PMN activados, en adición a aniones superóxido generados y otros metabolitos reactivos, también secretan iones H^+ dentro de los fagolisosomas, en respuesta a la estimulación por la ATPasa H^+ asociada a la membrana. La infección por cepas productoras de toxina vacuolizante; también está asociada con la úlcera gastroduodenal [25,26]. La observación de que la vacuolización *in vitro* es potenciada por la exposición de la toxina a bajos valores de pH, una vez activada VacA se hace resistente al efecto de la pepsina el cual es un indicio adicional de *H. pylori* para adaptarse al medio ambiente gástrico del estomago [27].

UREASA

El jugo gástrico normal posee un $pH < 4$, el cual le confiere un carácter bactericida ya que es capaz de eliminar a muchas de las bacterias que llegan al estómago con la ingesta de agua y alimentos, por ello epidemiológicamente se hace referencia al estómago como la “barrera ácida”. Por lo tanto, la colonización de la mucosa gástrica por *H. pylori*, implica la capacidad de esta bacteria para sobrevivir en ese ambiente ácido. Cuando se descubrió la bacteria su localización gástrica presumía un comportamiento acidófilo; pero la confirmación de que el pH óptimo para su cultivo era cercano a la neutralidad, se transformaba en uno de los retos importantes que se enfrentó al principio de la historia de *H. pylori*, pues a parte de aceptar que una bacteria tendría como nicho esa barrera ácida, no había una explicación para tal resistencia al pH ácido. La clave para la adaptación al pH gástrico reside en la producción de ureasa [28].

Esta enzima (urea amidohidrolasa) cataliza la hidrólisis de urea para proporcionar amonio y carbamato, el cual se descompone para producir otra molécula de amonio y ácido carbónico, con lo cual neutraliza el microambiente de las glándulas gástricas colonizadas (Fig.5). El

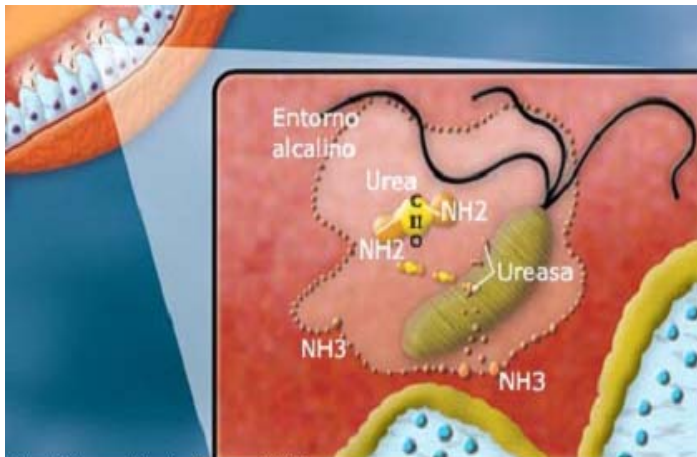


Fig. 5 Reacción de la urea [29]

efecto neto de esas reacciones es un aumento del pH. También explica el hecho de la asociación de la bacteria con los espacios intercelulares del epitelio gástrico, por los cuales se excreta urea. La ureasa es la enzima más estudiada de todos los productos de *H. pylori*, y representa alrededor de un 5% del total de sus proteínas celulares^[30]. Se localiza en el citosol de la bacteria y en su superficie, aunque esta última localización puede tratarse de un mecanismo no específico para la exportación de la enzima; posee un peso molecular de 600 kDa y está codificada por siete genes denominados *ureA* a *ureG* ^[31]. Los dos primeros *ureA* y *ureB* codifican las subunidades de 26.5 kDa y 60.3 kDa, respectivamente. Luego *ureC*, *ureD*, *ureE*, *ureF* y *ureG* son considerados genes accesorios, localizados en el cromosoma ^[32,33]. La enzima también provee nitrógeno para la síntesis protéica; este papel metabólico se sustenta en experimentos cultivando la bacteria en medios con urea con nitrógeno marcado, el cual luego se ha encontrado en las proteínas de la bacteria. El descubrimiento reciente del gen de la glutamina sintetasa *glnA*, sirve de base para sustentar este papel, ya que la única ruta por la cual el amonio puede ser incorporado en aminoácidos y proteínas es mediante el glutamato, para producir glutamina en la reacción catalizada por la glutamina sintetasa^[31].

Por otra parte, el hidróxido de amonio generado durante la hidrólisis de urea contribuye significativamente al daño histológico asociado con esta infección; aunque debe enfatizarse que directamente el amonio no es tóxico, si no que el daño infringido es el resultado del ión hidróxido generado por el equilibrio del amonio con el agua. Éste desdobra el moco gástrico, haciéndolo más fluido, con lo cual la bacteria puede desplazarse más fácilmente, para ganar los espacios intercelulares.

Pero, en esta capa de moco funciona uno de los mecanismos que protegen la mucosa del propio ácido, lo cual se conoce como el gradiente de bicarbonato; por lo tanto, al licuarse el moco se pierde parte de esa protección, lo que colabora en la génesis de la gastritis, máxime que las células G de la mucosa estarán detectando un pH neutro que promoverá la liberación de gastrina para estimular la producción de ácido. En última instancia, el paciente presenta hipergastrinemia e hiperacidez gástrica, lo que agrava la lesión inicial^[34].

PROTEÍNA CagA

CagA (citotoxina asociada al gen A) codifica una larga proteína (120-130kDa) de función desconocida. El nombre tiene historia por que se creía inicialmente que CagA se involucraba en la actividad citotóxica de vacuolización. En los países occidentales solo el 70% de las cepas de *H. pylori* posee el gen CagA, mientras que mas del 90% de las cepas de pacientes con úlcera con cagA⁺ ^[35]. La positividad cagA es estadísticamente asociado con síntomas severos de la enfermedad, por ejemplo, gastritis severa, atrofia de la mucosa y carcinoma gástrico. En Asia casi todas las cepas son cagA⁺ por que la función de cagA por si mismo sigue siendo evasivo hasta hoy en día. Las diferencias entre las cepas cagA⁺ y cagA⁻ no eran entendidas hasta que fue descubierto que cagA formaba parte de la Isla de Patogenicidad (PAI es una secuencia de genes que participa en la capacidad infecciosa de la bacteria). Las cepas que son cagA⁺ y cagA⁻ se diferencian en su capacidad de inducir ciertas respuestas en las células huésped. Las cepas cagA⁺ aumentan la expresión del factor nuclear κB (NFκB) que es un factor de la transcripción en células epiteliales y estimulan el lanzamiento de la Interleucina 8 (IL-8), una citosina que juega un papel central en la patogénesis de la gastritis por *H. pylori*. La inactivación de ciertos genes cag elimina la capacidad de la bacteria *H. pylori* para inducir la expresión de NFκB y el lanzamiento de IL-8 ^[36,37].

CATALASA

Es una de las enzimas producidas por la bacteria que desempeña una función importante como factor de virulencia, favorece la sobrevivencia de la bacteria en el tejido inflamado, la protege de las acciones fagocíticas de los neutrófilos, de los metabolitos reactivos de oxígeno (MRO) y la de otros mediadores químicos de la inflamación ^[38].

PROTEASA

Enzima que desintegra la estructura polimérica del *mucus* y debilita su función como barrera por la pérdida gradual de su viscosidad, lo cual aumenta la retrodifusión del ion hidrógeno ^[39].

LIPASA Y FOSFOLIPASAS A2 Y C

Son factores de virulencia importantes. Estas sustancias, liberadas por la bacteria en el sitio de la lesión, son capaces de degradar los fosfolípidos del *mucus* y disminuir su hidrofobicidad, como consecuencia de su fuerte actividad lipolítica, de ahí su importancia en la ulcerogénesis ^[40]. La lipasa y las fosfolipasas A2 y C, al generar lisofosfolípidos provistos de actividad lítica, pueden atacar la integridad de la membrana epitelial y favorecer la liberación de ácido araquidónico, con la consiguiente producción de leucotrienos y otros eicosanoides que contribuyen a la inflamación. Estos compuestos, además de su acción inflamatoria, también alteran la permeabilidad de la membrana celular y la regeneración del *mucus*. ^[41,42]

SUPERÓXIDO DISMUTASA

Enzima que se encuentra en altas concentraciones dentro del citoplasma del *Helicobacter pylori*, utilizada por dicho microorganismo como mecanismo de defensa contra el ataque fagocítico de los neutrófilos. Actúa como antioxidante al catalizar los metabolitos reactivos de oxígeno producidos por los neutrófilos, que pudieran dañarla. Estos hallazgos sugieren que *Helicobacter pylori* posee sus propios mecanismos de defensa que contribuyen a su acción patogénica sobre la mucosa gástrica.^[42]

FACTOR ACTIVADOR DE PLAQUETAS

La bacteria es capaz de sintetizar y liberar cantidades importantes del factor activador de plaquetas, con potente acción quimiotáctica sobre los neutrófilos y los eosinófilos, así como otras acciones inmunomoduladoras, incluyendo la proliferación de los linfocitos. Este factor es conocido también como un agente proulcerogénico en la mucosa gástrica por su acción sobre la adherencia y activación de los neutrófilos.^[43]

LIPOPOLISACÁRIDOS

Numerosos trabajos reportan que la membrana externa que cubre la bacteria, es capaz de actuar como material antigénico y estimular la respuesta inflamatoria. La membrana externa de la bacteria es rica en lipopolisacáridos, que son proteínas heterogéneas con baja actividad biológica, capaces de activar los monocitos y los neutrófilos; éstos, a su vez liberan citosina, eicosanoides, metabolitos reactivos de oxígeno, activan el complemento en el sitio de la lesión y perpetúan la respuesta inflamatoria, como mecanismo de defensa ante los daños de la bacteria, que al producir más lipopolisacáridos provoca lesión hística local y síntomas sistémicos (fiebre), por lo cual los lipopolisacáridos constituyen uno de los principales antígenos del *Helicobacter pylori*.^[44]

HEMAGLUTININAS

H. pylori es capaz de aglutinar eritrocitos debido a su interacción con glucosamidas de grupo sanguíneo, algunas de las cuales se expresan en células epiteliales, lo que indirectamente indica su actividad adherente ^[45].

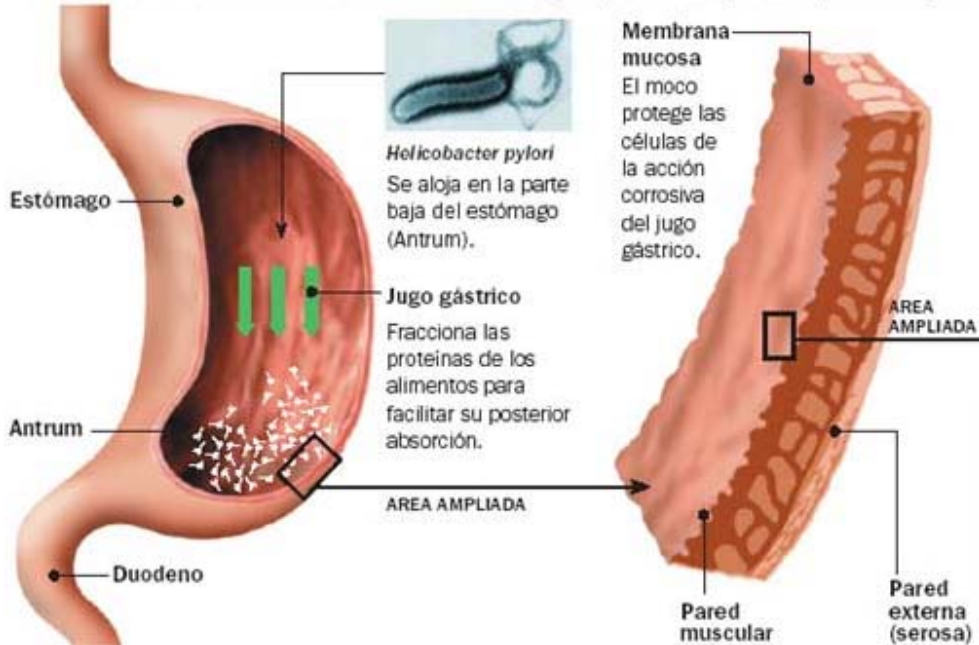
Se ha demostrado que *H. pylori* presenta cadenas laterales del Lipopolisacárido (LPS) que son similares a antígenos alélicos de los grupos sanguíneos Lewis^a (Le^a) y Lewis^b (Le^b). La cadena O - lateral del LPS es estructuralmente similar al Le^b. Por lo tanto, durante un proceso infeccioso por *H. pylori*, el huésped podría producir anticuerpos contra la bacteria y por reacción cruzada esos anticuerpos estarían reconociendo a los antígenos del grupo sanguíneo Lewis, los cuales también se expresan en la cadena β de la ATPasa H⁺ - K⁺ y en la bomba parietal de protones. El antígeno Lewis también se expresa en el receptor CD15 de neutrófilos, que induce la expresión de CD11b, que a su vez promueve su unión al endotelio. Por lo tanto la producción de autoanticuerpos cuyos blancos estarían expresados en la mucosa gástrica, da pie para postular que un mecanismo productor de la gastritis por *Helicobacter pylori*, es de carácter autoinmune^[46].

Las hemaglutininas solas no explican la adherencia *in vivo*, desde que algunos estudios han fracasado en demostrar la correlación entre títulos de hemaglutinina de las cepas de *H. pylori* y su habilidad para adherirse a células del epitelio gástrico de humanos o animales.

Una línea de *H. pylori* específica de unión a la superficie parece indicar mediación de estructuras fucosiladas y glicoproteínas pero no de moléculas de ácido siálico. La capacidad de tales receptores fucosilados es reducida con grupos sanguíneos A y B comparados con grupos O, explicando el alto riesgo de úlcera péptica en individuos de grupo O ^[47].

ORIGEN DE LA BACTERIA

No se conoce cómo se transmite la bacteria *Helicobacter pylori* pero se cree que es de padres a hijos.



COMO SE PRODUCE LA ULCERA

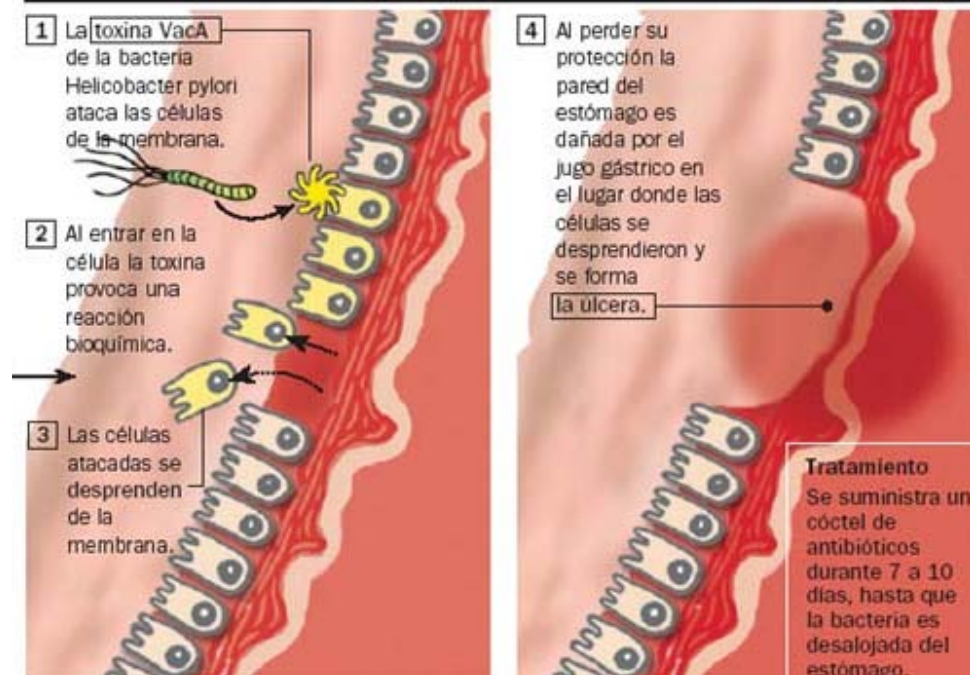


Fig. 6 Formación de la Úlcera [48].

1.2.4 EPIDEMIOLOGÍA

La infección con *H. pylori*, es un problema de salud mundial, el 70- 90% de la población mundial esta infectada, pero la mayoría cursa de forma asintomática. La infección se adquiere principalmente durante la niñez; en países en vías de desarrollo aumenta con la edad. Entre los 2-10 años de edad el 45-55% están infectados y a los 20 años el 80% están infectados por *H. pylori*.; la incidencia de la infección en niños menores de 10 años es de 10% anual. Mientras que en países desarrollados solo el 3.5% de los niños menores de 10 años y el 20% de las personas menores de 40 años están infectadas; en estos países la incidencia anual de infección es del 1%. La prevalencia de la infección por *H. pylori* varia entre diferentes grupos raciales y dentro del mismo grupo, el riesgo de infección a lo largo de la vida en países desarrollados es de aproximadamente 40-60% mientras que en países en vías de desarrollo es del 90%. [49].

En un estudio seroepidemiológico realizado en nuestro país en 1998 se encontró que el 20% de los niños menores de 1 año, están infectados; a los 10 años el 50% y a los 25 años el 80% de la población mexicana esta infectada. [50].

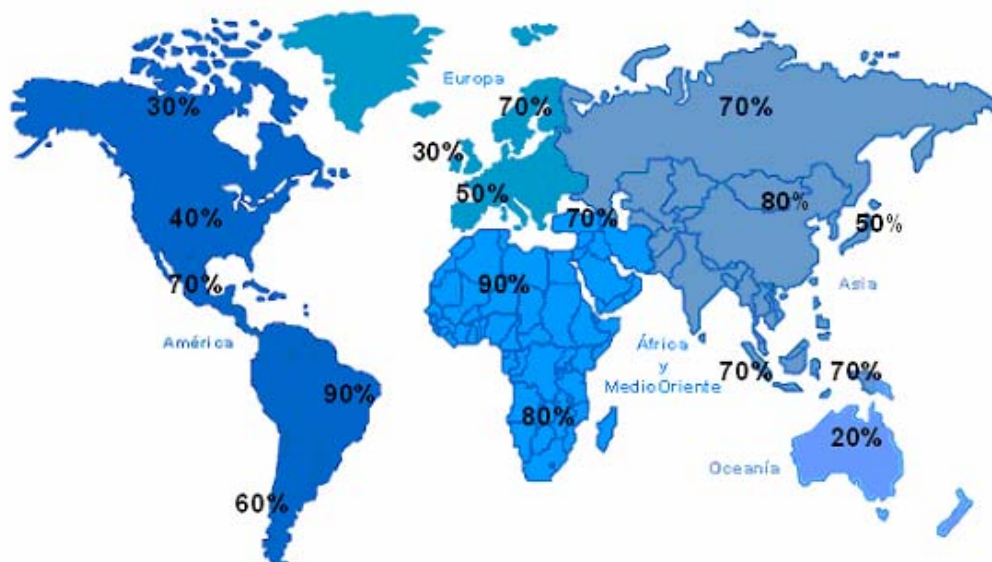


Fig. 7 Prevalencia de la infección por *H. pylori* en diferentes zonas geográficas. [51]

1.2.5 FACTORES DE RIESGO

En países en vías de desarrollo los causantes para la adquisición, permanencia y gravedad de la infección por *H. pylori* son la edad, bajo nivel socioeconómico, hacinamiento, raza ya que se ha demostrado por serología grandes diferencias en la prevalencia de la infección entre diferentes grupos raciales o étnicos de una misma área geográfica (blancos, negros e hispanos), falta de higiene, malos hábitos alimenticios (fumar, estrés, alcohol) y factores genéticos que determinan la interacción huésped-bacteria.

El factor de riesgo más importante para adquirir la infección en niños, es el contacto directo con adultos infectados dentro del ámbito familiar. Además de la mala nutrición y el desarrollo de enfermedades que disminuye la secreción ácida y favorecen la colonización por *H. pylori* [49].

1.2.6 TRANSMISIÓN

Se ha mencionado que la infección con *Helicobacter pylori* se adquiere temprano en la vida. Además afecta a más de la mitad de la población mundial, se presenta con mayor prevalencia en países en desarrollo que en los industrializados, lo que se ha asociado con el nivel sociocultural y económico de la población [52].

La infección se relaciona con mecanismos de transmisión directa o indirectamente asociados con la higiene ambiental. Lo que también ha permitido explicar la alta prevalencia encontrada en individuos mayores de 50 años de países industrializados [52], lo cual se explica por un efecto de cohorte. Según estos criterios, es posible que esos individuos de países desarrollados vivieron una niñez en ambientes con condiciones higiénicas como las que hoy prevalecen en muchos países en vías de desarrollo [53]. Tal patrón epidemiológico hace suponer que la vía de infección es común y muy efectiva. En tal sentido se han propuesto por lo menos tres rutas de transmisión: oral-oral, gastro-oral y feco-oral. [52,54]

TRANSMISIÓN ORAL-ORAL

El hallazgo de *Helicobacter pylori* en placa dental, en saliva o bien en la identificación de su genoma en saliva ha sido la base de tal propuesta de transmisión; también se apoya en las reacciones positivas de ureasa en muestras de saliva; pero otras bacterias de flora oral podrían dar positiva esta prueba por lo que tal prueba no es muy aceptada. El obstáculo para esta posibilidad es el pobre acervo bibliográfico relacionado con el cultivo de la bacteria a partir de muestras orales. [55, 56, 57]

TRANSMISIÓN ORO-GÁSTRICA

Este tipo de ruta se apoya en la ocurrencia de algunos brotes asociados con manejo y desinfección inadecuada de gastroscopios. Tal posibilidad llevaría también a relacionarlo con el vómito, lo que en cierta medida podría explicar las altas tasas de infección de niños, ya que estos vomitan con mayor frecuencia que los adultos, además que se llevan objetos a la boca [57, 58].

TRANSMISIÓN FECO-ORAL

Esta vía explica fácilmente la marcada diferencia en la prevalencia de *Helicobacter pylori* en países en desarrollo comparada con países desarrollados, cuyo patrón guarda una cierta semejanza con las tasas de enfermedades diarreicas en esos mismos países [59].

La dificultad de aislar *Helicobacter pylori* a partir de heces se relaciona con su alta susceptibilidad *in vitro* a los antimicrobianos empleados en medios de cultivo selectivos [60].

La identificación del genoma de esta bacteria en agua potable, tanto en países en desarrollo como en países industrializados apoya la transmisión fecal de este agente [61]. La diseminación de la bacteria con las heces de los pacientes infectados lleva a la posibilidad de que las moscas puedan actuar como vectores mecánicos de la infección. En tal sentido se ha documentado la sobrevivencia de la bacteria en moscas domésticas infestadas experimentalmente, alimentándolas con cultivos de *Helicobacter pylori* e incluso se ha hallado el genoma de la bacteria en moscas infectadas naturalmente [62, 63].

TRANSIMSIÓN IATROGENICA

Se considera el tipo de transmisión menos común y se atribuye al uso de endoscopios, tubos, sondas y algunos otros instrumentos (mal lavados) que han estado en contacto con la mucosa gástrica de una persona infectada y son introducidos en un paciente sano. La ruta iatrogénica es importante sobre todo en lugares donde se tiene mucha demanda de atención clínica y muchos pacientes son examinados en un período muy corto de tiempo usando el mismo endoscopio ^[64].

TRANSMISIÓN A TRAVÉS DE VECTORES

Se ha reportado el aislamiento de *Helicobacter pylori* a partir de gatos, sugiriendo a éstos como posibles transmisores de la infección. También se ha reportado el aislamiento de microorganismos parecidos a *Helicobacter pylori* de moscas domésticas, sugiriendo a este organismo como otro posible vector (generalmente es un organismo que transmite un agente infeccioso desde los individuos afectados a otros que aún no portan ese agente), sin embargo ésta última posibilidad ha sido poco aceptada ^[17].

1.2.7 DIAGNÓSTICO

Existen diferentes métodos para diagnosticar la infección por *H. pylori*. Los métodos pueden diferenciarse según el tipo de muestra que se utiliza, si requieren o no la endoscopia (agresivos o no agresivos) y a la forma de detectar el microorganismo (directamente la propia bacteria o de forma indirecta) ^[65].

	AGRESIVOS (Biopsia gástrica)	NO AGRESIVOS
Directos	Cultivo Histología Técnicas moleculares	Técnicas moleculares: jugo gástrico, saliva o heces. Antígeno en heces.
Indirectos	Ureasa rápida	Prueba del aliento con urea (UBT) Serología Anticuerpos saliva

Tabla 3. Métodos de Diagnóstico para *H. pylori*

1.2.7.1 METODOS DIRECTOS

Histología

Permite la observación del microorganismo espiralar y el estudio anatomopatológico de la muestra gástrica y los posibles cambios originados (gastritis crónica con nódulos linfoides). Existen diferentes tipos de tinciones que, sin ser específicas para *H. pylori*, permiten su detección.

- Tinción de hematoxilina- eosina: El estudio histológico se realiza perfectamente y se puede valorar la infección por *H. pylori*.
- Tinción de plata Warthin – Starry: Emplea el nitrato de plata, lo que otorga una buena visualización del microorganismo.
- Tinción de Giemsa: Es la de elección, ya que permite una correcta identificación del microorganismo y es barata y rápida de ejecutar. No es adecuada para el estudio anatomopatológico de la muestra gástrica.
- Tinción de Gram: Precisa una muestra de biopsia fresca y no aporta información histológica de la pieza.
- Otras técnicas: Inmunohistoquímica o inmunofluorescencia con anticuerpos mono/policonales frente a *H. pylori*.^[66,67]

Cultivo

Contrario a la suposición de que *H. pylori* es una bacteria fastidiosa, es posible aislarla e identificarla fácilmente. La muestra para el estudio bacteriológico es una biopsia que debe ser macerada. El medio de cultivo que se emplea es Agar Sangre sin antimicrobianos y las placas se incuban en microaerobiosis por 5 días a 35°C. Esta atmósfera microaerofílica puede crearse con sobres generadores de CO₂ y N₂ como el CampyPak o con el sobre empleado para anaerobiosis; también puede lograrse incubando las placas en una incubadora con una atmósfera de CO₂ del 10 al 15%.



Fig. 8 Jarra para Anaerobiosis

Sin embargo, un método económico y sencillo consiste en colocar las placas en un frasco de vidrio de boca ancha, y la atmósfera se genera con una vela encendida y una tableta efervescente de antiácido, tipo Alka-Seltzer®, la cual se coloca con unos 10 ml de agua en una bolsa plástica adherida a la pared del frasco para economizar espacio^[68]. A los cinco días de incubación en una muestra positiva se obtienen colonias de aproximadamente 1mm de diámetro, claras, transparentes, brillantes y convexas, que a la tinción de Gram muestran bacilos curvos Gram negativos, que son ureasa, catalasa y oxidasa positivos. La tinción de Gram o una tinción de flagelos ayuda a la identificación de la bacteria, pues como indicábamos previamente se trata de un bacilo curvo, Gram negativo, con un mechón de 4 a 7 flagelos en un sólo extremo de la bacteria. Sin embargo, para la tinción de Gram debe contrateñirse con fucsina básica, pues con safranina esta bacteria se colorea muy levemente y es difícil de observar^[69].

Test rápido de la ureasa

No es una prueba de gran costo y permite en escaso tiempo (hasta en una hora) obtener el diagnóstico. Al producir ureasa, el *Helicobacter pylori* hidroliza la urea, se forman iones amonio, aumenta el pH de la solución y se produce un viraje del color del indicador. Se dispone de varias pruebas basadas en la ureasa, aunque las más utilizadas son el CLO-Test, el caldo urea de Christensen y las soluciones de urea a concentraciones variables, todas ellas con sensibilidad y especificidad elevadas.

La concordancia y el valor predictivo positivo ronda el 100% cuando se comparan los resultados de la prueba de la ureasa con los métodos histológicos ^[70].

Otras técnicas

Pruebas moleculares (Reacción en cadena de la polimerasa PCR): La sensibilidad y especificidad son muy elevadas, cercanas al 100% y se reservan para estudios de investigación. Es una prueba compleja que requiere un equipo sofisticado y un personal experimentado, por lo que tiene un costo elevado.

Citología con cepillado endoscópico: Es una buena técnica de identificación, aunque agresiva sobre la cobertura epitelial que puede llegar a romperse y exponer al *H. pylori* a la acción de los jugos gástricos, lo que reduciría su sensibilidad.

Técnicas con aspirado gástrico: No requieren estrictamente la realización de una endoscopia, aunque si precisan la introducción de una sonda nasogástrica para obtener la muestra ^[70].

1.2.7.2 METODOS INDIRECTOS

Prueba del aliento con urea marcada (¹³C o ¹⁴C)

El test del aliento con urea marcada (Urea Breath Test – UBT) se basa en la capacidad de la ureasa producida por el *H. pylori* para hidrolizar rápidamente una solución de urea marcada previamente con ¹³C o ¹⁴C valorando la totalidad de la mucosa gástrica. Es una prueba fácil, cómoda, simple de realizar, bien tolerada, que detecta infección activa incluso ante cantidades pequeñas de *Helicobacter pylori*, siendo el medio óptimo de control y seguimiento de pacientes sometidos a tratamiento erradicador ^[71,72].

Serología

Es una prueba sencilla, barata, basada en la detección de anticuerpos en el período comprendido entre los 3 y los 6 meses inmediatamente posteriores al tratamiento, las pruebas serológicas indican únicamente infección previa por *Helicobacter pylori* y no discriminan entre personas con infección activa y enfermedad de aquellos pacientes infectados pero asintomáticos. El valor de la serología como método de control es muy limitado, aunque resulta útil en estudios epidemiológicos o cuando no se puede realizar la endoscopia u otros métodos diagnósticos en individuos sin terapia erradicadora ^[70].

Alternativas Diagnósticas

General: Ni la PCR ni los anticuerpos en saliva son apropiados para el uso clínico rutinario. Se deberían realizar campañas educativas que informen a los médicos de atención primaria sobre los métodos más apropiados para la evaluación de la infección causada por *Helicobacter pylori*.

Dispepsia: Pacientes con historia personal de úlcera péptica o con úlceras complicadas (sangrantes) que no estén asociadas al uso de AINEs se les debería buscar *H. pylori* y erradicar, si están infectados. La confirmación de la erradicación se hará con urea breath test 4 o 6 semanas después del fin del tratamiento.

Infección en niños: Se realizarán pruebas no invasivas como la serología, prueba de urea en el aliento (urea breath test C-13) o antígeno en heces ^[65.73].

1.3 ANTIMICROBIANOS

Desde el siglo XVII se han empleado sustancias químicas para el tratamiento de las enfermedades infecciosas; en 1889 Vuillemin, en un trabajo titulado *Antibiose et symbiose*, crea el término antibiosis para describir la lucha entre seres vivos por la supervivencia. Mas tarde, Ward adopta esta palabra para describir el antagonismo microbiano.

Con posterioridad, ya en plena era antibiótica, significó: sustancia extraída de seres vivos, ya fueran bacterias, hongos, algas etc., con capacidad de anular la vida de diversos microorganismos, pero no fue si no hasta el siglo XX, que comienza la quimioterapia como ciencia con los estudios de Paul Ehrlich quién fue el primero en formular los principios de la toxicidad selectiva y reconocer las reacciones químicas específicas entre los microorganismos y los medicamentos, ya que descubrió que las arsefaminas (compuestos con base en arsénico) atacan al *Treponema pallidum*, causante de la sífilis en el hombre.

Durante el transcurso del siglo pasado la investigación terapéutica se centró principalmente en las sustancias de origen microbiano. Además del desarrollo de la penicilina descubierta por Fleming en 1929, se dio el de otras sustancias como la estreptomina, tetraciclina, cloramfenicol y otras ^[74].

1.3.1. DEFINICIÓN

Los antimicrobianos son un grupo de fármacos que están continuamente en uso pues constituyen la base fundamental del tratamiento de enfermedades infecciosas entendiéndose por antimicrobiano como aquellos compuestos obtenidos a partir de microorganismos ya sean bacterias, hongos, levaduras, etc., (antibiótico) y los producidos por síntesis química (quimioterapéutico). ^[75]

El término antibiótico fue propuesto inicialmente para definir a sustancias que ocasionan la destrucción de la vida, tomando en cuenta lo anterior se puede decir que cualquier agente mecánico, físico o químico capaz de matar sería un antibiótico, pero no puede tomarse en cuenta dicho concepto puesto que según los estudios de Waksman un “antibiótico” se define como una sustancia química derivada o producida por microorganismos que tienen la capacidad de inhibir el desarrollo o destruir bacterias y otros microorganismos ^[75] .

Los microorganismos que producen los diferentes antibióticos tienen una amplia distribución en la naturaleza, sin embargo, de los varios cientos producidos de forma natural que se han purificado sólo un mínimo de ellos han resultado lo suficientemente poco tóxicos como para ser utilizados en la práctica médica ^[74].

1.3.2. CLASIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN

La mayoría de los antibióticos son moléculas, con regiones hidrofóbicas que facilitan el transporte al interior de la célula. Muchos poseen varios anillos, algunos de los cuales mejoran la interacción de la molécula con la bacteria de manera que se pueden clasificar según su origen, efecto antimicrobiano, espectro de actividad y mecanismo de acción. Respecto a éste último es preciso tener presente que puede haber un cierto número de estadios entre el efecto inicial o primario del fármaco y la consiguiente muerte celular. Además algunos agentes pueden tener más de un sitio primario de ataque o mecanismo de acción ^[74].

ORIGEN

- **Naturales:** Se obtienen a partir de microorganismos bien sean hongos, bacterias etc.
- **Sintéticos:** Se obtienen totalmente por síntesis química
- **Semisintéticos:** Se obtienen por modificaciones químicas de antimicrobianos naturales, con el fin de mejorarlos ^[74,76].

EFECTO

- **Bacteriostático:** La máxima concentración no tóxica que se alcanza en suero y tejidos impide el desarrollo y multiplicación de microorganismos, sin destruirlos, pudiendo estos multiplicarse nuevamente al desaparecer el agente antimicrobiano.
- **Bactericida:** Su acción es letal sobre los microorganismos, por lo que éstos pierden irreversiblemente su viabilidad o son lisados ^[74,76].

MECANISMO DE ACCIÓN

- **Inhibición de la síntesis de la pared celular:** Inhiben la síntesis de peptidoglicano mediante la inhibición de la incorporación de la D-alanina al pentapéptido y la inhibición de la transpeptidación que dan origen a la rigidez de la pared.

- **Inhibición de la función de la membrana citoplasmática:** Son altamente tóxicos interfieren en la integridad de metabolitos y nutrientes de las bacterias.
- **Inhibición de la síntesis proteica:** Inhiben a nivel RNA polimerasa.
- **Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos:** Actúan en la fase de duplicación y transcripción, que daña la multiplicación y metabolismo de la célula ^[75].

ESPECTRO DE ACTIVIDAD

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

- **Amplio:** Actúan sobre un gran número de especies bacterianas.
- **Intermedio:** Actúan sobre un número limitado de microorganismos.
- **Reducido:** Actúan sobre un pequeño número de especies microbianas ^[77].

ESTRUTURA QUÍMICA

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

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

1. Ser más bactericidas que bacteriostáticos
2. Mantenerse activos en presencia de plasma y líquidos corporales
3. Que sean efectivos frente a un amplio espectro de microorganismos.

4. Los microorganismos susceptibles no se deben volver resistentes genética o fenotípicamente.
5. No deben ser tóxicos y los efectos colaterales adversos tienen que ser mínimos para el huésped ^[75].

1.3.3. TIPOS DE AGENTES ANTIMICROBIANOS

Desde el punto de vista práctico existen:

- **Desinfectantes:** Solo se aplican a sistemas inanimados y eliminan la carga microbiana
- **Sanitizantes:** Solo se aplican a sistemas inanimados y disminuyen la carga microbiana.
- **Antisépticos:** Reducen y controlan la presencia de microorganismos potencialmente patógenos, solo se pueden aplicar externamente en seres vivos (piel y/o mucosas)
- **Antimicrobianos de uso sistémico:** Reducen y controlan la presencia de microorganismos que han invadido los tejidos. Actúan en el organismo, pudiendo ser ingeridos (vía oral), absorbidos (apósitos) y/o inyectados ^[74].

1.3.4. RESISTENCIA BACTERIANA

Cada antibiótico se caracteriza por un espectro natural de actividad antibacteriana. Este espectro comprende las especies bacterianas que, en su estado natural, sufren una inhibición de su crecimiento por concentraciones de su antibiótico susceptibles de ser alcanzadas *in vivo*. A éstas especies bacterianas que no se encuentran incluidas dentro de dicho espectro se denominan naturalmente resistentes.

El antibiótico no crea resistencia, pero selecciona las bacterias resistentes eliminando las sensibles. Es lo que se conoce con el nombre de presión de selección. El aumento de la frecuencia de las cepas resistentes va unido casi siempre al uso intensivo del antibiótico en cuestión ^[78].

La **resistencia natural** es un carácter constante de todas las cepas de una misma especie bacteriana. El conocimiento de las resistencias naturales permite prever la inactividad de la molécula frente a bacterias identificadas (después del crecimiento) o sospechosas (en caso de antibioterapia empírica). En ocasiones, constituye una ayuda para la identificación, puesto que ciertas especies se caracterizan por sus resistencias naturales.

Ejemplos: Resistencia natural del *Proteus mirabilis* a las tetraciclinas y a la colistina. Resistencia natural de la *Klebsiella pneumoniae* a las penicilinas (ampicilina, amoxicilina).

La **resistencia adquirida** es una característica propia de ciertas cepas, dentro de una especie bacteriana naturalmente sensible, cuyo patrimonio genético ha sido modificado por mutación o adquisición de genes. Contrariamente a las resistencias naturales, las resistencias adquiridas son evolutivas, y su frecuencia depende a menudo de la utilización de los antibióticos. En el caso de numerosas especies bacterianas, y teniendo en cuenta la evolución de las resistencias adquiridas, el espectro natural de actividad no es ya suficiente para guiar la elección de un tratamiento antibiótico. En ese caso, se hace indispensable el antibiograma.^[79]

La **resistencia cruzada** es cuando se debe a un mismo mecanismo de resistencia. En general, afecta a varios antibióticos dentro de una misma familia (Ejemplo: La resistencia a la oxacilina en los estafilococos se cruza con todas los β -lactámicos). En ciertos casos, puede afectar a antibióticos de familias diferentes (Ejemplo: La resistencia por impermeabilidad a las ciclinas se cruza con la resistencia al coloramfenicol y al trimetoprima).^[79]

La **resistencia asociada** es cuando afecta a varios antibióticos de familias diferentes. En general, se debe a la asociación de varios mecanismos de resistencia (Ejemplo: La resistencia de los estafilococos a la oxacilina va frecuentemente asociada a las quinolonas, aminoglicósidos, macrolidos y ciclinas)^[79].

MECANISMOS DE LA RESISTENCIA ADQUIRIDA

La definición clínica de un microorganismo resistente, a diferencia de uno sensible, está asociada con la habilidad que tenga un antimicrobiano de ser efectivo en el tratamiento de una infección específica.

1. Alteración del sitio blanco
 2. Alteraciones en la permeabilidad o transporte
 3. Inactivación del antibiótico
- El **mecanismo genético** de adquisición de una resistencia puede ser:
 - La mutación de un gen implicado en el modo de acción de un antibiótico: Este mecanismo afecta preferentemente a ciertos antibióticos: quinolonas, rifampicina, fosfomicina, antituberculosos y a veces cefalosporinas.
 - La adquisición de genes de resistencia transferidos a partir de una cepa perteneciente a una especie idéntica o diferente: Ciertos Antibióticos están particularmente afectados por este mecanismo: β -lactámicos, aminoglicósidos, tetraciclinas; cloranfenicol, sulfamidas.
 - El **mecanismo bioquímico** de la resistencia puede ser:
 - Una producción por la bacteria de enzimas que inactivan el antibiótico.
 - La modificación del blanco del antibiótico ^[80].

1.3.5 TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN POR *Helicobacter pylori*

Dieciséis años después del reconocimiento del papel del *H. pylori* en la etiopatogenia de la úlcera duodenal, la búsqueda del tratamiento “ideal” para erradicar la infección, continúa. Hasta la actualidad, se han publicado múltiples trabajos que han comparado un gran número de tratamientos de duración muy variable, de 24hrs. Hasta 4 semanas, que han utilizado diversos fármacos en múltiples combinaciones y a dosis diferentes. El tratamiento “ideal” anti-*H. pylori* deberá ser eficaz, barato, fácil de seguir por el paciente y sin efectos secundarios.

Debe conseguir una erradicación superior al 80% cuando se administran con intención de tratar, e inducir la menor resistencia posible a los antibióticos. Uno de los factores que influyen más en la eficacia del tratamiento y en la aparición de resistencias secundarias, sobre todo en las pautas de tratamiento corto, es el concluir el tratamiento por parte del paciente ^[81].

Los principales fármacos utilizados para el tratamiento de la infección por *H. pylori* son los que a continuación se enumeran:

a) Bloqueadores de la acidez

1. Benzimidazoles sustituidos

- Pantoprazol
- Lanzoprazol
- Omeprazol

2. Bloqueadores de H₂

- Ranitidina
- Nizatidina
- Famotidina

b) Antimicrobianos

- Metronidazol
- Tinidazol
- Tetraciclina
- Amoxicilina
- Claritromicina^[82]

ESQUEMAS DE TRATAMIENTO

Las pautas de tratamiento triple, que incluyen un inhibidor de la bomba de protones y dos antibióticos, administradas durante una semana, son por ahora las pautas de primera elección, recomendadas en las diversas conferencias de consenso realizadas en Europa y Asia; son las que se han administrando de forma mayoritaria en los centros de atención primaria^[83]. En general, la eficacia terapéutica de la combinación de un inhibidor de la bomba de protones con claritromicina y amoxicilina o metronidazol es similar. La prevalencia de cepas resistentes a claritromicina o metronidazol, los precios del tratamiento y las opciones de una segunda pauta terapéutica, son factores que pueden ser determinantes a la hora de establecer el tratamiento de elección. Sin embargo, cuando se utiliza Ranitidina-citrato de bismuto (RBC), la eficacia terapéutica de la combinación de claritromicina con un nitroimidazol (metronidazol, tinidazol) es algo superior a la obtenida cuando se combina con claritromicina y amoxicilina^[84]. Consiguen una tasa de curación mucho más elevada que con un solo antibiótico (terapia “dual”). Estos tratamientos son bien tolerados por los pacientes y con una alta tasa de erradicación tal como se ha demostrado en los diversos estudios, aunque en ocasiones estas tasas han mostrado diferencias según donde se han realizado los estudios; se ha descrito una menor eficacia de estos tratamientos según si se administran dentro de estudios protocolizados o de forma rutinaria en los centros de atención primaria.

Además, la eficacia de estos tratamientos puede estar comprometida por la resistencia a los antibióticos, en especial a la claritromicina.^[85]

Cuando fracasa el tratamiento triple, se recomienda, como procedimiento de segunda elección, las pautas cuádruples, que combinan un inhibidor de la bomba de protones, subcitrato de bismuto coloidal, metronidazol o tinidazol y amoxicilina o tetracilina. Las tasas de erradicación obtenidas con estas terapias son altas, pero tienen el inconveniente de ser peor toleradas por los pacientes, dado el importante número de fármacos que deben de ingerir.

A pesar de ello, muchos expertos sugieren que las pautas cuádruples deberían ser utilizadas como primera elección, en áreas con alta tasa de resistencia a claritromicina, para el fallo del tratamiento triple en estos casos y prevenir la aparición de resistencias secundarias ^[86].

En resumen para el tratamiento por *H. pylori* se han utilizado 3 tipos de terapias:

1. **Terapia Dual:** Un antibiótico + Un Inhibidor de la Bomba de Protones (IBP). Tiene buenos resultados pero se causa resistencia por las bajas dosis de antibióticos.
2. **Terapia Triple:** Dos antibióticos + 2 IBP. Es la terapia más recomendada. Puede llegar a alcanzar la erradicación del 95%.
3. **Terapia Cuádruple:** Dos antibióticos en dosis elevadas + 2 IBP.

ESQUEMA DE TRATAMIENTO	DOSIS
Inhibidor de la Bomba de Protones + Claritromicina + Amoxicilina	Dosis estándar 500mg 1000mg
Inhibidor de la Bomba de Protones + Claritromicina + Metronidazol	Dosis estándar 500mg 1000mg
Ranitidina con Citrato de Bismuto + Claritromicina + Metronidazol	400mg 500mg 1000mg
Ranitidina con Citrato de Bismuto + Claritromicina + Metronidazol	400mg 500mg 400mg
Tabla 4. Esquemas de tratamiento de siete días contra la infección de <i>H. pylori</i> ^[87]	

1.4 MEDICINA TRADICIONAL

Los inicios de la Medicina Tradicional Herbolaria se remontan desde el comienzo mismo de la humanidad. No existe documentación escrita para determinar desde cuando el hombre utiliza plantas con funciones medicamentosas pero resulta evidente que fue desde etapas muy tempranas de la evolución y muchísimo antes de que apareciera la escritura e incluso el lenguaje.

Muestra del uso de plantas y preparados a partir de ellas lo podemos encontrar en el estudio de cualquiera de las culturas que han existido, frecuentemente asociado a rituales mítico-mágicos; algunas de estas plantas continúan usándose en la actualidad, e incluso la preparación y sus formas de uso persisten inalterables.

A principios del siglo XX, el desarrollo de la química y el descubrimiento de complejos procesos de síntesis orgánica desembocaron en la puesta en marcha, por parte de la industria farmacéutica, de medicamentos fabricados en los laboratorios a partir de procesos sintéticos, lo que mermó la utilización de plantas medicinales naturales, la síntesis de medicamentos a partir de los principios activos de las plantas medicinales provocó un fuerte impulso en el estudio de esas plantas por parte de los grandes laboratorios farmacéuticos, pero sus descubrimientos se mantenían muchas veces ocultos por fuertes intereses económicos. Con el lanzamiento al mercado de cada vez mayores medicamentos de síntesis y con el despliegue de enormes campañas de propaganda para su utilización la fitoterapia perdió terreno.

Con el transcurso del tiempo y la experiencia adquirida en el cada vez mayor problema de las complicaciones y efectos adversos de los medicamentos de síntesis ha comenzado un resurgir por la utilización de medicamentos naturales. Muchos investigadores rompiendo las barreras de los tabúes se han volcado al estudio de las plantas medicinales, y con el auge de los medios de comunicación ya es imposible ocultar sus beneficios y las propiedades de ellas ^[88].

Aunque se reconoce que es difícil proponer una definición de la Medicina Tradicional que se adapte a todas las formas y tradiciones existentes en el mundo, el Programa de Medicina Tradicional de la **OMS** propone:

“La suma de conocimientos, habilidades, y prácticas basadas en teorías, creencias y experiencias, originaria de distintas culturas, sea explicable o no, utilizada para el mantenimiento de la salud, así como en la prevención, diagnóstico, mejoramiento y tratamiento de enfermedades físicas y mentales.”

La Organización Mundial de la Salud (OMS) desde 1976 ha estado promoviendo la utilización apropiada de los sistemas tradicionales de medicina como parte de los programas de Atención Primaria de Salud, que comprende el empleo de plantas medicinales y de la acupuntura.

El hombre ha buscado en la flora de su hábitat, de forma empírica, los medicamentos contra las enfermedades que le son propias, relacionadas con su ambiente, son conocidos desde la antigüedad múltiples ejemplos de especies medicinales que hoy tienen vigencias absolutas.

En la actualidad, la explotación de la flora continúa, pues hay alrededor del 98 % sin explorar, lo que constituye un recurso excepcionalmente vasto en productos biológicamente activos, que pueden ser útiles, por sí o bien, pueden servir como fuente natural de prototipos químicos para el desarrollo de derivados modificados (con actividades incrementadas y/o toxicidad reducida).

La OMS y muchas organizaciones prestigiosas fomentan y financian planes de desarrollo, con el objetivo de fundamentar, con el debido rigor científico, la utilización de las plantas medicinales; es decir, la aplicación de las plantas medicinales tradicionales se recomienda que se efectúe sobre una base científica que valide la efectividad terapéutica y la relativa inocuidad de éstas. ^[88].

1.4.1 HERBOLARIA

La herbolaria es la aplicación de la botánica a la medicina; es decir, al uso de hierbas contra las enfermedades que aquejan al hombre y a otras especies, para reestablecer la salud. Los químicos han aislado principios activos, uno o varios, de una sola planta, y los han denominado fármacos o medicamentos y la farmacología se ha encargado de estudiar algunas de sus propiedades en los seres humanos, principalmente, para darles una utilización en las enfermedades diversas que aquejan al hombre y a los animales. Los medicamentos de origen vegetal son aproximadamente una cuarta parte de los que se encuentran en el mercado. ^[89]

En México se tiene estimado que existen cerca de 30,000 especies de plantas, de las cuales en 1998 el Instituto Nacional Indigenista documentó 3000 con usos medicinales, lo que equivale al 10% de la riqueza florística del país y 100 de ellas registran una demanda comercial muy alta. ^[90]

El Biólogo M.C. Mauricio González Ferrara describe que en la herbolaria internacional se habla de 3 países en cuanto a cultura herbolaria se refiere: México, India y China; sin embargo México no tiene el mismo nivel de desarrollo e investigación en herbolaria que la India, China o países europeos.

La investigación de plantas medicinales consta de diferentes disciplinas: etnomedicina, la farmacología, la fitoquímica, la toxicología, la investigación clínica, la biotecnología y el diseño de medicamentos. Este proceso de investigación no puede ser desarrollado por un solo grupo, en realidad es una larga cadena en la que debe intervenir mucha gente, diferentes instituciones, dependencias de gobierno y particularmente la industria. ^[91]

Las plantas medicinales, son aquellas que contienen compuestos bioquímicos que al entrar en contacto con el organismo humano son capaces de actuar sobre determinados procesos morbosos produciendo un efecto terapéutico o se utilizan como materia prima para la producción de medicamentos ^[88].

A lo largo de los años se han utilizado muchas hierbas y fórmulas botánicas en la terapia de la úlcera péptica. Los remedios con hierbas para la úlcera péptica comparten un efecto similar en la estimulación de las defensas naturales del organismo frente a la ulceración.

En concreto, se opina que los compuestos naturales que contienen las hierbas estimulan la producción y secreción de compuestos mucosos que recubren el tracto digestivo y previenen las lesiones de los tejidos ^[92]. Algunas de las plantas útiles para combatir la úlcera péptica son las siguientes: Marrubio vulgar, Trébol de agua, Caléndula, Cardo benedictino, Malvavisco, Tormentila, Bistorta, Cola de caballo y Poleo ^[93]. Entre todas estas plantas también se encuentra el Cuachalalate (*Amphypterygium adstringens*), que es una de las 10 especies de mayor uso medicinal a nivel nacional sobre todo en el estado de Morelos ^[94].

1.4.2 CUACHALALATE

Clasificación Taxonómica



Fig. 9 Cuachalalate ^[95]

Nombre Científico: *Amphypterygium adstringens* Schiede ex Schelch.

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Sapindales

Familia: Julianaceae

Género: *Amphipterygium*

Especie: *adstringens* ^[96, 97].

Sinonimia Científica

Amphipterygium adstringens (Schlecht.) Schiede, *Hypopterygium adstringens* Schlecht y *Juliania adstringens* Schlecht ^[98, 99, 100].

Sinonimia Vulgar

Cuachalalate, cuachalalá, matixerán (Michoacán), volador (Puebla), chalalate, coachalalate, cuachalalatl (Distrito Federal), macerán, paupeco, cuachinalá (Oaxaca) ^[101].

Descripción de la planta



Fig. 10 Árbol de Cuachalalate ^[102]

Árbol de 10m de altura, con el tronco torcido de corteza moreno grisáceo o gris plumizo con grandes escamas, las hojas están agrupadas en las puntas de las ramas en número de tres a cinco, en el anverso son verde opaco y en el reverso verde grisáceo. Las flores pueden encontrarse solitarias o en ramilletes.

Los frutos son nueces abultadas y alargadas que están en ramas de color verde pálido. Ésta especie es de clima cálido y templado, se encuentra desde los 100 hasta los 1300 metros sobre el nivel del mar ^[103].

Distribución Geográfica

El género es de origen americano y crece desde México hasta Perú. Se distribuye en la vertiente del Pacífico desde Nayarit hasta Oaxaca, incluyendo la cuenca del río Balsas. Esta especie es originaria de México y se puede encontrar en los estados de Guerrero, Morelos, Michoacán, México, Nayarit, Jalisco, Puebla, Chiapas, Sinaloa, y Oaxaca.

Crece en la selva tropical caducifolia, subcaducifolia, matorral xerófilo e inclusive en bosque espinoso, mesófilo de montaña y pino-encino. Esta especie puede progresar bien en zonas sujetas a incendios periódicos ^[91].

Usos

El Cuachalalate es una planta medicinal comúnmente usada en México. La parte que más se utiliza es la corteza y se ha reportado su uso en la medicina popular durante varios años y en diversas áreas del país. Las propiedades curativas atribuidas a esta planta ancestral son dadas por la gente que habita en diversas regiones en donde vegeta este árbol ya sea por información transmitida de generación en generación, por observación directa o por la transmisión oral o escrita. ^[104].



Fig. 11 Principales Estados de la República Mexicana donde se utiliza el Cuachalalate.^[17]

El uso principal es el cocimiento de la corteza, como tratamiento de úlceras, cáncer de estómago, gastritis, lesiones cutáneas, endurecimiento de encías, tifoidea, tifo, y heridas antiguas. También se remoja la corteza para el tratamiento de úlceras. En el caso de heridas, puede aplicarse hecha polvo o macerada en agua. Para el tratamiento de granos y llagas se utiliza la resina de la corteza, que puede ser aplicada a animales domésticos. Así mismo se utiliza para tratar rozaduras de bebés, mordeduras o piquetes de animales ponzoñosos y como cicatrizante ^[105,106].

Forma de preparación	Usos	Aplicación
Remojado	Cicatrizante	Como agua de uso
Pomada	Cicatrizante	Local
Jarabe	Tos	Se toma 3 - 4 veces al día
Tónico	Fortalecer el pulmón, asma, tos	Se toma 1- 3 veces al día
Té	Cicatrizante	Se toma varias veces al día

Tabla 5. Usos y Forma de preparación del Cuachalalate ^[107]

CONTRAINDICACIONES

No se debe de ingerir por largos períodos, se recomienda utilizar en ciclos de dos semanas; con una de descanso. Su uso en grandes dosis puede afectar la vista ^[108].

COMPOSICIÓN QUÍMICA Y METABOLITOS ACTIVOS

Las investigaciones del Cuachalalate en fotoquímica se han realizado principalmente en la corteza del árbol, ya que es parte de la planta que se emplea para ejercer su efecto terapéutico. Esta corteza es en general lisa, de pigmento rosado pardo rojizo muy intenso y cuando se prepara el extracto acuoso, queda muy concentrado ^[109].



Fig. 12 Corteza de Cuachalalate ^[108]

Los compuestos de interés que lograron aislar e identificar fueron los triterpenos: ácidos masticadienoico, 3 α -hidroximasticadienoico y mezclas de ácidos masticadienoico/isomasticadienoico en plantas del sexo femenino. Mientras que en las del sexo masculino se encontraron mezclas de ácido masticadienoico con un compuesto desconocido. La mejor acumulación del ácido masticadienoico ocurrió en febrero y la del 3 α -hidroximasticadienoico fue en noviembre.

Otras fuentes mencionan la presencia de compuestos benzílicos, tales como los ácidos 6-heptadecil, 6-nonadecil y 6-pentadecil salicílico además del β -sitosterol. En las hojas, se ha identificado el ácido cuachalálico el cual también es un triterpeno.

Uno de los compuestos aislados de la corteza del cuachalalate fue el ácido masticadienoico y se extrae del mastic; éste se presenta en forma de un lagrimeo amarillo o amarillo verdoso de 3 mm de diámetro. Las lágrimas son quebradizas pero se hacen plásticas al ser masticadas. La resina es una mezcla compleja de ácidos tri, tetra y penta cíclicos y alcoholes triterpenoides. El ácido masticadienoico es uno de los ácidos triterpenoides tetracíclico.

Otro de los componentes que se encontraron en el cuachalalate es el β -sitosterol. Tal compuesto es el fitosterol más abundante en la dieta y se distribuye ampliamente en el reino plantae.

Un tercer tipo de compuestos son los ácidos salicílicos. Como el nombre lo indica, la base de todos ello es el ácido salicílico o salicilato. Los salicilatos en general son inhibidores reversibles de la ciclooxigenasa excepto el ácido acetilsalicílico, que la inactiva irreversiblemente una vez que la ha acetilado.

Los salicilatos de sodio, colina, el salicilato magnésico de colina y la aspirina se emplean como antipiréticos y analgésicos en el tratamiento de la gota, fiebre reumática y artritis; de ahí la inferencia de que los efectos del cuachalalate son de tipo analgésico y antiinflamatorio [110].

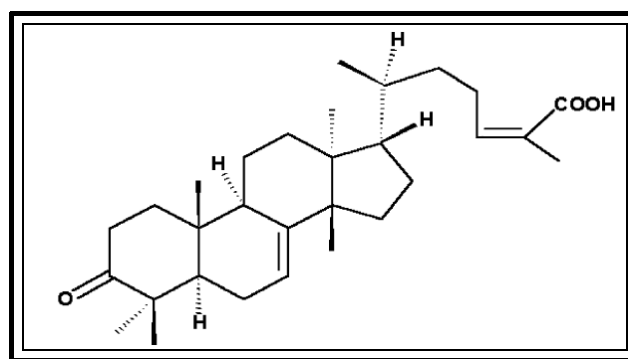


Fig. 13 Ácido masticadienónico

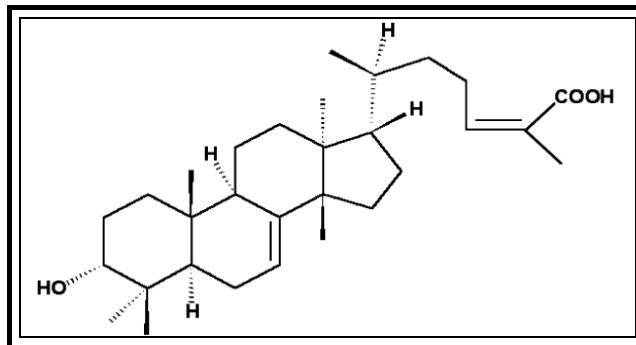


Fig. 14 Ácido 3 α – hidroximasticadienónico

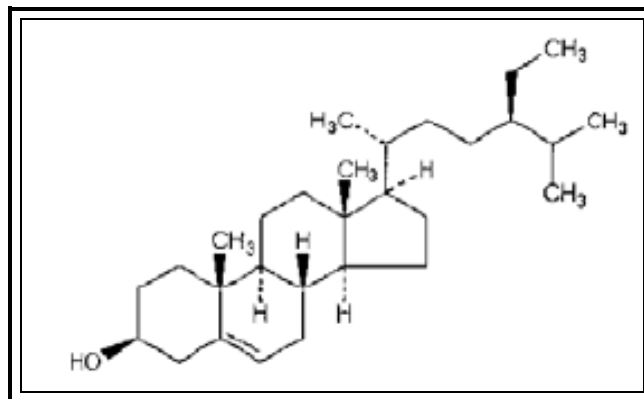


Fig.15 β -sitosterol

EXPERIMENTACIÓN FARMACOLÓGICA

Se ha comprobado la actividad antitumoral de un extracto metanólico de la planta, administrado a ratones por vía intramuscular con tumores mamarios tipo carcinoma. También se ha demostrado el efecto hipocolesterolemianta a través de extracto hexánico administrado a ratas ^[111].

Se realizó una prueba farmacológica anti-inflamatoria con el ácido α -hidroximasticadienónico en ratas Wistar macho y se observó una fuerte inhibición de la inflamación a una dosis de 10mg/Kg con un 93% de disminución del edema ^[112].

Existen estudios con extractos metanólicos y hexánicos, sin embargo también el extracto acuoso de Cuachalalate ha resultado altamente efectivo en el tratamiento de úlceras gástricas y duodenales, esto demostrado en una evaluación farmacológica de la acción

antiulcerosa de una infusión de Cuachalalate a diferentes dosis mediante una curva dosis efecto gradual en ratas Wistar. Aunque todavía falta conocer el mecanismo por el cual esta planta corrige problemas gastrointestinales, algunos autores señalan que el Cuachalalate puede tener un efecto citoprotector y cicatrizante en la mucosa gástrica.^[113]

Mediante estudios experimentales, se ha comprobado la actividad antiulcerosa de los extractos acuosos de la corteza, la cual no se relaciona con el efecto antagonista de los receptores H₂ de la histamina^[114]. También se ha demostrado que varias fracciones del extracto metabólico de la corteza de esta planta tienen un efecto gastroprotector, el cual se postula como el mecanismo de acción^[115]. Además se han estudiado sus propiedades para actuar como filtro solar, el extracto de Cuachalalate tiene la capacidad de absorber las radiaciones ultravioleta^[116].

Los componentes químicos activos del Cuachalalate representan potencial de desarrollo para el país a través de la elaboración de productos farmacéuticos y el avance de investigaciones biomédicas^[117].

APROVECHAMIENTO Y CONSERVACIÓN DEL CUACHALALATE

Algunas de las recomendaciones que se hacen es que, por ejemplo, el aprovechamiento de la corteza no supere los ocho o diez milímetros. El corte debe ser homogéneo sin descortezar hasta nivel de madera, porque además de dañar seriamente la fisiología del árbol, su regeneración es deficiente y también es probable no se pueda descortezar de nueva cuenta.

Asimismo, se recomienda descortezar en placas de 60 centímetros de longitud y 50 por ciento del perímetro del árbol. Esto debe hacerse en forma alterna y en espiral. Es decir, si se saca una placa en dirección norte, la siguiente se quitará en dirección este, la siguiente en dirección sur hasta cubrir todo el tronco.

Deben dejarse de cinco a diez centímetros sin descortezar entre placa y placa en todo el perímetro del tronco, pues no se recomienda descortezar todo el tronco, porque se tendrían problemas con la regeneración de corteza. Por ningún motivo se deben descortezar árboles menores de diez años de edad o que tengan 15 centímetros o menos de diámetro.

Los árboles mayores a este diámetro pueden aprovecharse bajo las recomendaciones arriba anotadas y tener la seguridad de que se tendrá una buena respuesta de regeneración de corteza para un segundo aprovechamiento. La época de descortezamiento más recomendable es de mayo a julio y la parte descortezada debe cubrirse con plástico blanco. Con este sencillo procedimiento se reduce la deshidratación, el agrietamiento y se obtiene una corteza de buena textura y con la calidad necesaria para uso tanto tradicional como farmacéutico ^[118].

1.5. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Es un equipo complejo que funciona al alto vacío por ello no se puede observar ningún material vivo ni que contenga agua, la imagen está dada por los electrones transmitidos a través de la muestra, por eso se requiere que sea de un grosor menor a 100nm para obtener una buena resolución; además debe estar protegida con metales pesados que soporten la interacción de los electrones de alta energía. ^[119]



Fig. 16. Microscopio Electrónico de Transmisión.
Tomada en el Laboratorio de Microscopía.
FES-Cuautitlán. Campo 1

En este microscopio se utilizan electrones en vez de rayos de luz, y como lentes funcionan unos electroimanes llamadas lentes electromagnéticas. Cuando los electrones pasan a través de la preparación algunos son difractados creando entonces una imagen que se hace visible en una pantalla fluorescente de ZnS sensible a los electrones. La longitud de onda de la radiación de los electrones es mucho más pequeña que la de la luz visible y, como el poder resolutivo de un microscopio es inversamente proporcional a la longitud de onda utilizada. La resolución y aumentos totales obtenidos con el microscopio electrónico son mucho mayores que la conseguida con el microscopio óptico.^[120]

1.5. TINCIÓN NEGATIVA

La tinción negativa es una técnica sencilla y económica y su uso se ha generalizado como técnica fundamental para contrastar muestras particuladas (7). El contraste se obtiene embebiendo la partícula a observar en una sal de un metal pesado (ácido fosfotungstico al 2%, el acetato de uranilo al 4%), que perfila mínimos detalles ultraestructurales sobre un fondo oscuro; de ahí su denominación como técnica de “contraste negativo”, o de tinción negativa. Siempre que se aplique esta técnica, es necesario trabajar con rejillas cubiertas por un soporte o membrana plástica (fomvar o colodión), para evitar que la muestra líquida se escurra entre los agujeros de la rejilla. La tinción negativa se aplica al estudio de microorganismos (virus, bacterias, protozoarios), fragmentos celulares (membranas) y macromoléculas aisladas (proteínas).^[121]

1.6. ENSAYO COLORIMÉTRICO DE MOSSMAN CON 3-(4,5-DIMETILTIAZOL-2-IL)-2,5-DIFENILTETRAZOLIO (MTT).

Mossman en 1983 desarrolla este método, siendo modificado por Francois Denizot y Rita Lang. El MTT, también conocido como Azul de Tiazol, es una sal de tetrazolio soluble en agua. En solución tiene una coloración amarilla. La prueba colorimétrica de MTT ha sido previamente descrita para medir citotoxicidad y proliferación celular así como para un índice de medición de activación celular ambos cuantitativa y cualitativamente.

La prueba de MTT se basa en la capacidad de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de las células viables para transformar la sal de MTT tetrazolio (de color amarillo), en un producto de color azul (MTT formazan).

La intensidad del color azul será proporcional al número de células vivas presentes. La absorbancia del colorante se mide a una longitud de onda de 590nm o a la longitud más cercana ^[122]

1.7. DILUICIÓN EN TUBO

La cuantificación *in Vitro* de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante alguna de las variantes de los métodos de dilución. Estas técnicas son utilizadas para medir semicuantitativamente la actividad *in Vitro* de un agente antimicrobiano frente a un cultivo de una cepa bacteriana y permiten determinar la CMI que es la menor concentración del antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento bacteriano. Esto se basa en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo ^[122].

La reproducibilidad de estas pruebas es de +/- 1 dilución para evitar una gran variabilidad, estas técnicas deben ser estandarizadas y controladas cuidadosamente, son muy útiles en el estudio de nuevos agentes antimicrobianos como el que se quiere probar en este trabajo ^[122].

2. HIPOTESIS

Si el extracto acuoso de Cuachalalate es un agente antimicrobiano, entonces podrá inhibir el crecimiento de *Helicobacter pylori* y así tener una nueva alternativa para las enfermedades causales de esta bacteria

3. JUSTIFICACIÓN

Helicobacter pylori afecta aproximadamente al 50% de la población mundial con una prevalencia mayor en los países en vías de desarrollo que en los desarrollados. Participa en la etiología de la gastritis, úlcera péptica y duodenal e incluso se asocia con algunos tipos de cáncer gástrico.

La infección con *H. pylori* se asocia con un 70% de los casos de gastritis crónica activa y con el 90 a 95% de las úlceras duodenales y con un 60% de pacientes con cáncer.

El cáncer gástrico ocupa el 2° lugar entre las neoplasias gástricas de diagnóstico más frecuente a nivel mundial.

La resistencia de *H. pylori* a los antibióticos es una preocupación global cada vez mayor que necesita la atención de la salud pública.

La corteza de *Amphipterygium adstringens*, conocida como cuachalalate, ha tenido bastante aceptación en las personas que hacen uso de ella para el tratamiento de las patologías gástricas del agente causal *Helicobacter pylori*.

4. OBJETIVO GENERAL:

- Evidenciar el efecto inhibitorio del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) en *Helicobacter pylori* usando el reactivo MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-Difeniltetrazolio) y la tinción con el ácido fosfotúngstico.

4.1. OBJETIVOS PARTICULARES:

- Aprender el manejo de *Helicobacter pylori* bacteriológicamente.
- Obtener un extracto acuoso de (*Amphipterygium adstringens*) estéril por filtración con membrana de 0.22µm.
- Realizar ensayos de *Helicobacter pylori* (26695) y el extracto de cuachalalate por medio de la técnica de microdilución en placa, evidenciando los resultados con el MTT.
- Realizar ensayos de *Helicobacter pylori* y el extracto de cuachalalate por medio de la técnica de dilución en tubo para obtener un volumen grande de bacterias para ser observadas aplicando la técnica de tinción negativa con ácido fosfotúngstico, en el Microscopio Electrónico de Transmisión.

5. METODOLOGÍA

Extracto acuoso de Cuachalalate.

Se calentaron 100mL de agua destilada hasta ebullición en un matraz erlenmeyer de 250mL con rosca, se adiciono 4.5 gr. de Cuachalalate. Se retiro del fuego y se dejo reposar 10min. Se filtro empleando un embudo de vidrio y papel filtro del No. 3 Whatman® y se dejo enfriar a temperatura ambiente. Después se filtro con membranas de 5.0, 0.8, 0.45 μ m. Posteriormente la infusión se esterilizo por filtración con una membrana estéril de 0.22 μ m.



Fig. 17 Método de filtración

Posteriormente se realizo un sembrado masivo del Extracto en Agar BHI para comprobar la esterilidad del extracto de Cuachalalate, incubándola a 37°C por 24hrs. para su observación, en la cual no hubo crecimiento bacteriano por lo tanto el extracto es estéril.

Para determinar la concentración se pesaron 3 viales ámbar con similitud de peso en una balanza analítica; los cuales fueron lavados, secados y esterilizados en autoclave en una balanza analítica y se adiciono 1mL del extracto a cada uno; estos viales se colocaron en un horno Pasteur manteniendo la temperatura a 36°C hasta la total evaporación del extracto. Los viales se volvieron a pesar y con el promedio de las diferencias de pesos se obtuvo la concentración.

NOTA: La Infusión de Cuachalalate se utilizó el mismo día de la preparación, esto se debe a la inestabilidad de sus componentes.

OBTENCIÓN DE CEPAS DE *Helicobacter pylori*

La cepa fue proporcionada por el M. en C. Gerardo González Valencia del Hospital General Siglo XXI, Hospital de Pediatría en la Unidad de Enfermedades Infecciosas. Laboratorio de Bacteriología.



Fig. 18 Manejo de la cepa de *Helicobacter pylori*

La cepa *Helicobacter pylori* 26695, aislada originalmente de un paciente de Reino Unido con gastritis, se escogió por su capacidad de colonizar cerdos y provocar en ellos una respuesta inmunitaria e inflamatoria. Se trata de una cepa toxigénica (*vacA+*), que presenta un genoma circular de 1.667.867 pares de bases y 1.590 genes, con un tamaño medio de 945 pares de bases cada uno, similar al observado en otras células procariotas. Más del 70 % de sus proteínas tenían un punto isoeléctrico mayor de 7.0. Los aminoácidos básicos -arginina y lisina- están presentes con una frecuencia doble en *H. pylori* respecto *H. influenzae* y *E. coli*, lo que quizás refleja su adaptación al medio gástrico ácido. De acuerdo con un nicho ecológico tan restrictivo, *H. pylori* presenta una gran capacidad de biosíntesis y reparación, en un intento por adaptarse al medio. La supervivencia en condiciones tan ácidas depende, en parte, de su habilidad para generar un potencial positivo intracitoplasmático en condiciones de bajo pH.

CORROBORACIÓN DE LA CEPA *Helicobacter pylori*

Se cultivo en Agar Sangre al 10%; a 37°C bajo condiciones microaerófilas, durante 5 días por ser una bacteria con requerimientos específicos. Se realizaron pruebas como tinción de Gram, Oxidasa, Catalasa, Motilidad en gota suspendida y la prueba de Ureasa de Christensen (VER ANEXO 2).

DILUICIÓN EN TUBO

Prueba cualitativa. Una vez identificada la cepa, se procede a realizar el ensayo. Todo el procedimiento se realiza en condiciones de esterilidad, incluyendo el material utilizado. La bacteria se siembra por estría en una placa de agar Sangre y se incuba 72 horas a 37 ° C en condiciones de microaerofilia. Cumplido el tiempo de incubación, se estandariza la bacteria con ayuda de la escala de Mac Farland utilizando el tubo 0.5 con caldo BHI a doble concentración, esto se debe a que cuando se agregue el extracto acuso de *Cuachalalate*, la concentración del caldo será la establecida por el fabricante para el óptimo crecimiento del microorganismo .

Previamente se tienen tres juegos de once tubos estériles con taparrosca, con los cuales se realizan dobles diluciones y se rotulan como sigue:

- Tubo 1 bacteria / solución concentrada
- Tubo 2 bacteria / solución a concentración 1:2
- Tubo 3 bacteria / solución a concentración 1:4
- Tubo 4 bacteria / solución a concentración 1:8
- Tubo 5 bacteria / solución a concentración 1:16
- Tubo 6 bacteria / solución a concentración 1:32
- Tubo 7 bacteria / solución a concentración 1:64
- Tubo 8 bacteria / solución a concentración 1:128
- Tubo 9 Control positivo caldo SSF + Bacterias
- Tubo 10 Control negativo SSF + Cuachalalate
- Tubo 11 Blanco SSF+ Cuachalalate + BHI

Se procede a realizar las diluciones con 1mL solución salina fisiológica estéril, después se deposita 1mL de bacteria estandarizada al 0.5 de Mac Farland en cada tubo, excepto en los tubos 10 (Control -) y 11 (Blanco).

Una vez realizado lo anterior, los once tubos se dejan en incubación 48 horas a 37° C. en condiciones de microaerofilia con las tapas parcialmente abiertas. Al cumplirse dicho tiempo se realiza la observación de los tubos, comparando la turbidez tomando como referencia el control positivo y negativo.

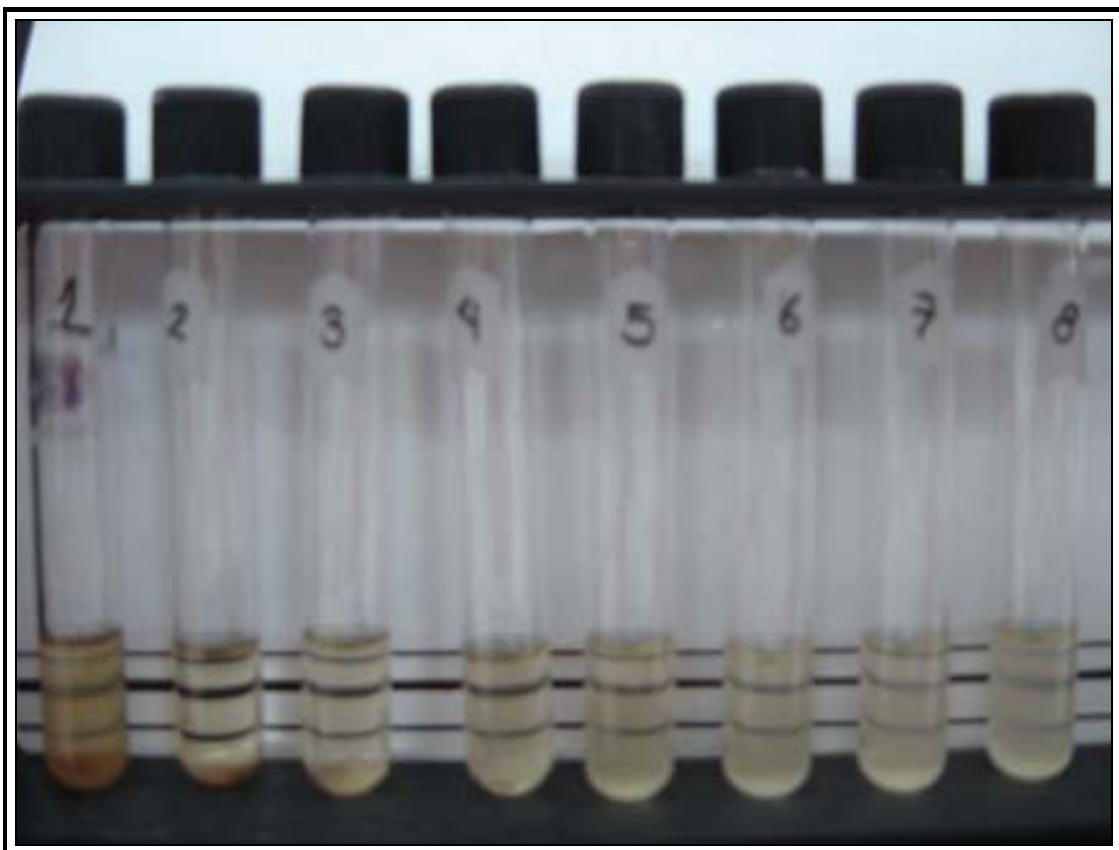


Fig.

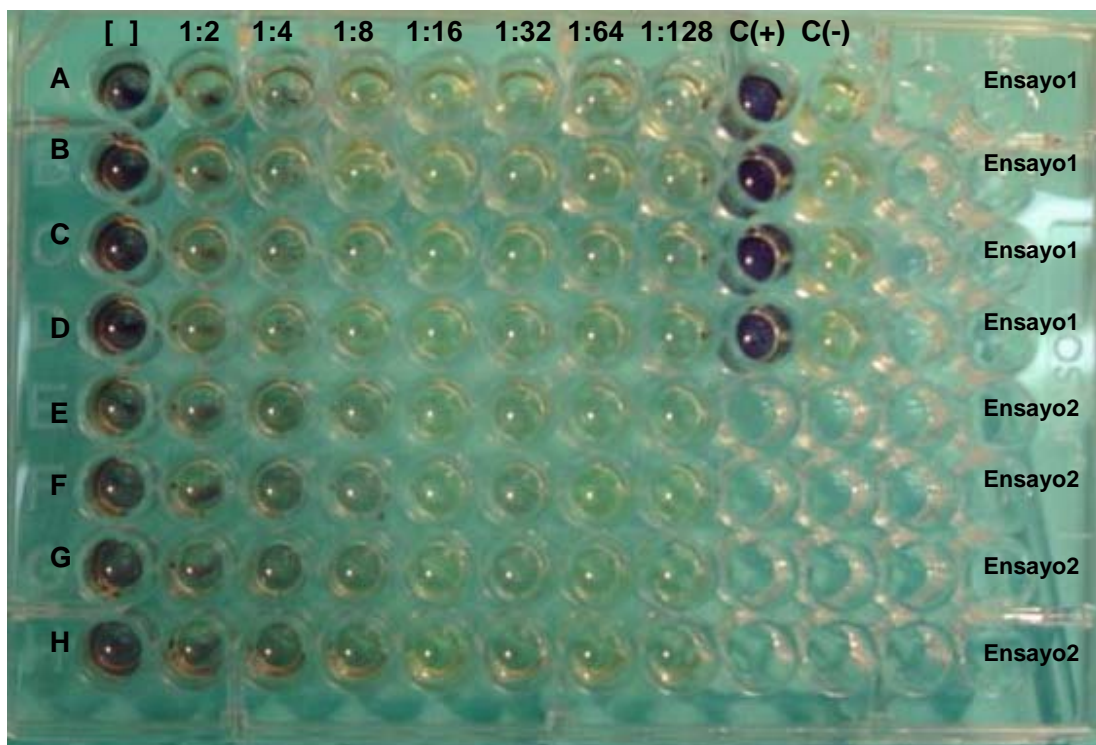
19 Método de dilución en tubo

Prueba cuantitativa con la técnica de MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.

Ésta es realizada con los mismos tubos del ensayo cualitativo una vez que se han realizado las anotaciones correspondientes de los resultados obtenidos.

En condiciones de esterilidad se procede al ensayo cuantitativo. Se rotula una microplaca como sigue:

Fig. 20. Rótulos en microplaca.



Con ayuda de micropipetas de volúmenes ajustables y de puntas estériles se realiza el llenado de los pozos como sigue:

- * 90 μ L del Tubo 1 en el pozo A1
- * 90 μ L del Tubo 2 en el pozo A2
- * 90 μ L del Tubo 3 en el pozo A3
- * 90 μ L del Tubo 4 en el pozo A4
- * 90 μ L del Tubo 5 en el pozo A5
- * 90 μ L del Tubo 6 en el pozo A6
- * 90 μ L del Tubo 7 en el pozo A7
- * 90 μ L del Tubo 8 en el pozo A8
- * 90 μ L del Tubo 9 en el pozo A9 (control +)
- * 90 μ L del Tubo 10 en el pozo A10 (control -)
- * 90 μ L del Tubo 11 en el pozo A11 (Blanco)

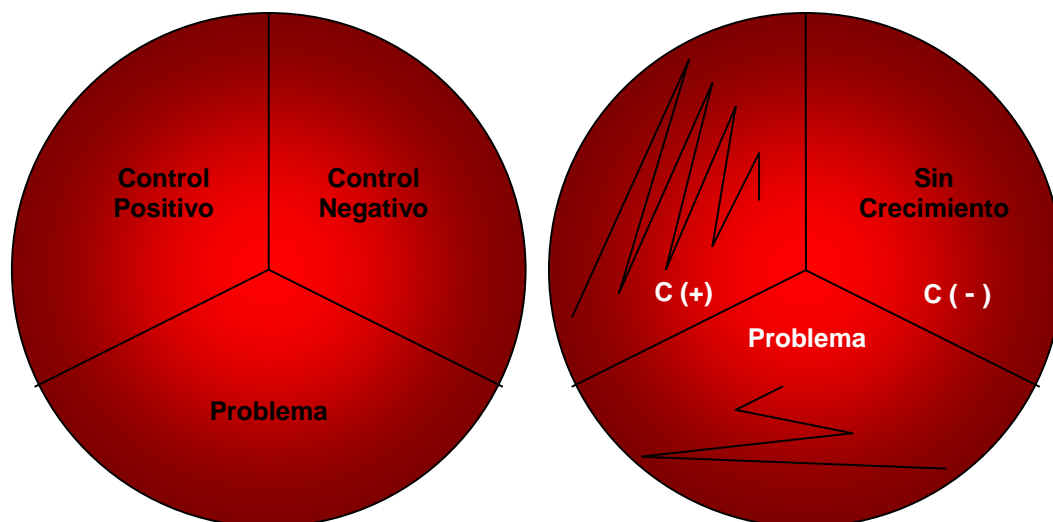
Una vez terminado lo anterior se agrega a cada pozo 10 μ L de reactivo de MTT. Se incuba la microplaca a 37° C por 3 horas. Al cabo de este tiempo se realiza la lectura correspondiente en un lector de ELISA a 590 nm (BIORAD). Con esta prueba se determinará la Concentración Mínima Inhibitoria de *Amphipterygium adstringens* con *Helicobacter pylori*.

COMPROBACIÓN DE EFECTO BACTERICIDA O BACTERIOSTÁTICO.

Este ensayo se efectúa a partir de la prueba cualitativa de la cual se toman los tubos: Controles positivo y Controles negativo, así como el Tubo 1 el cual es nuestro problema. En condiciones de esterilidad se toma una asada y se siembra en una placa de Agar Sangre al 10%, la placa se rotula (Fig. 21) y se incuba 72 horas a 37 °C en atmósfera de CO₂.

Pasado este tiempo se realizan las lecturas y anotaciones correspondientes.

Fig. 21. Placa petri rotulada y placa petri con los resultados de muestra inoculada.



MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

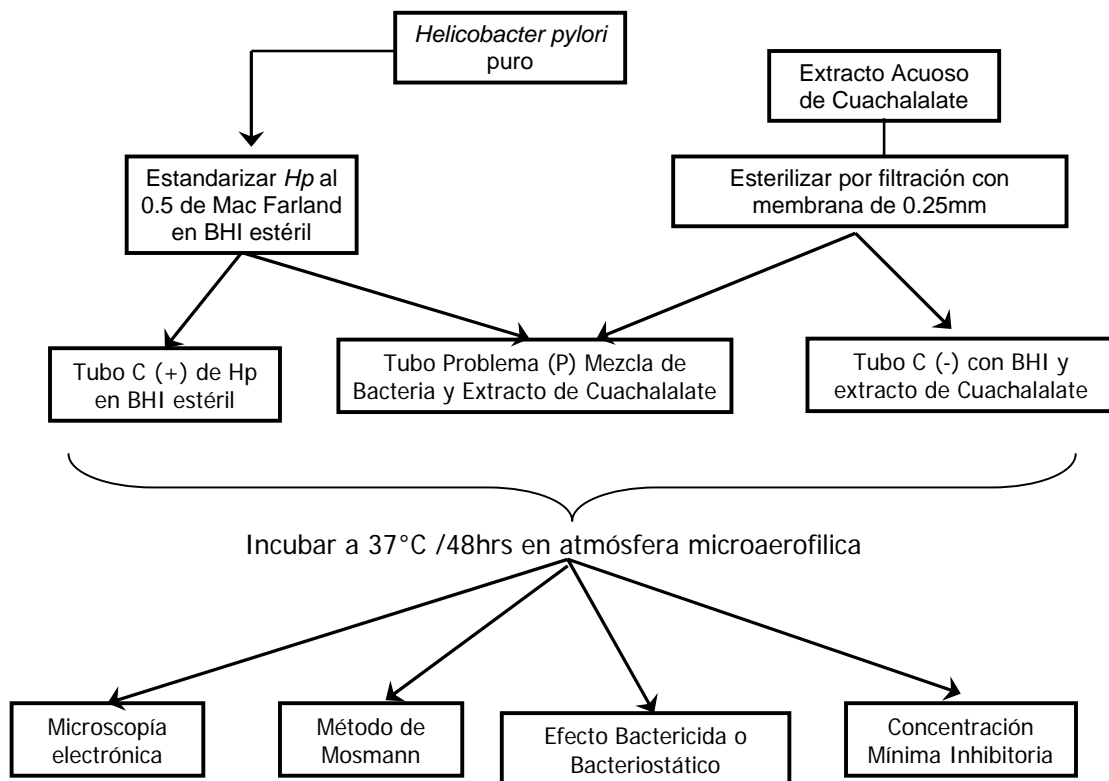
PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

La suspensión bacteriana se centrifuga a 2000rpm 5min para la muestra problema y para el control positivo a 2000rpm durante 10min; eliminar el sobrenadante; a la pastilla agregarle 2mL de Karnosky dejar reposar por 1 hora; volver a centrifugar a 2000rpm durante 10min; eliminar el fijador para posteriormente resuspender con 3 mL un Buffer de Fosfatos estéril.

TINCIÓN NEGATIVA

Una gota de suspensión bacteriana se deposita sobre un papel parafilm, y se colocan 2 rejillas con membrana fomvar para que se adsorba la muestra durante 20 min; posteriormente se toman las rejillas con unas pinzas y el exceso se adsorbe con papel filtro y enseguida son teñidos con una gota de ácido fosfotúngstico (AFT solución al 1% con pH=7.2) durante un período que varía entre 5 y 30 min; las rejillas son recogidas y se adsorbe el exceso de colorante y son secadas a temperatura ambiente o en una estufa a 35°C. Las muestras son observadas y fotografiadas en el Microscopio Electrónico de Transmisión. JEOL JEM 100S

6. DIAGRAMA DE TRABAJO



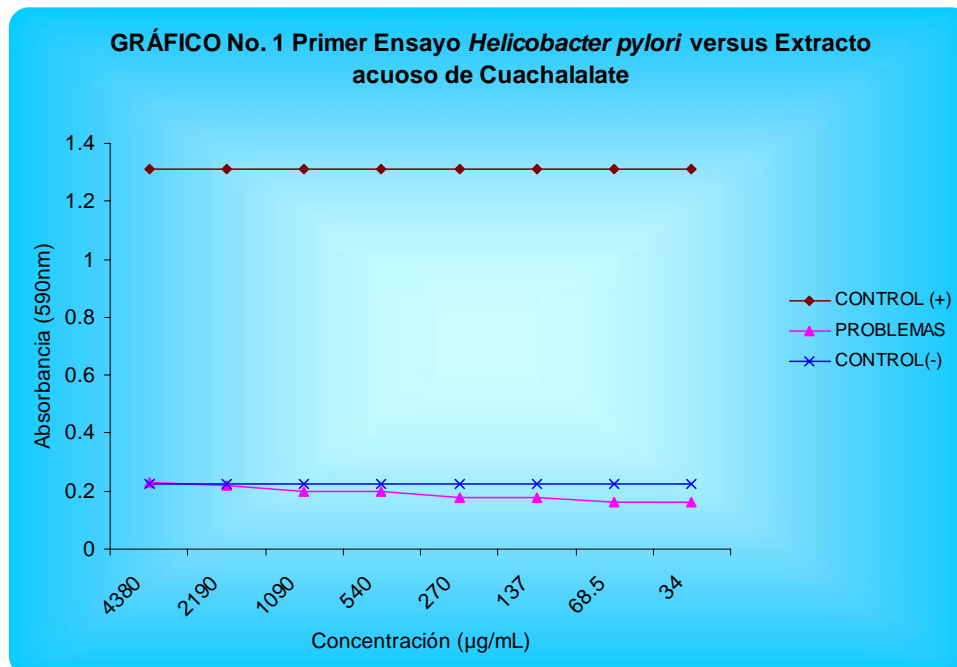
7. RESULTADOS

Después de haber realizado una revisión hemero-bibliográfica; encontramos una sola referencia que habla del ensayo de Cuachalalate con *Helicobacter pylori* (Castillo Juárez; et al., 2007); esto quiere decir que hay muy poca investigación del efecto de este extracto con esta bacteria causante de patologías gástricas.

Se hicieron tres ensayos de los cuales obtuvimos 24 lecturas similares, determinando sus absorbancias en el Elisómetro donde se calculó la media para tener mejores resultados.

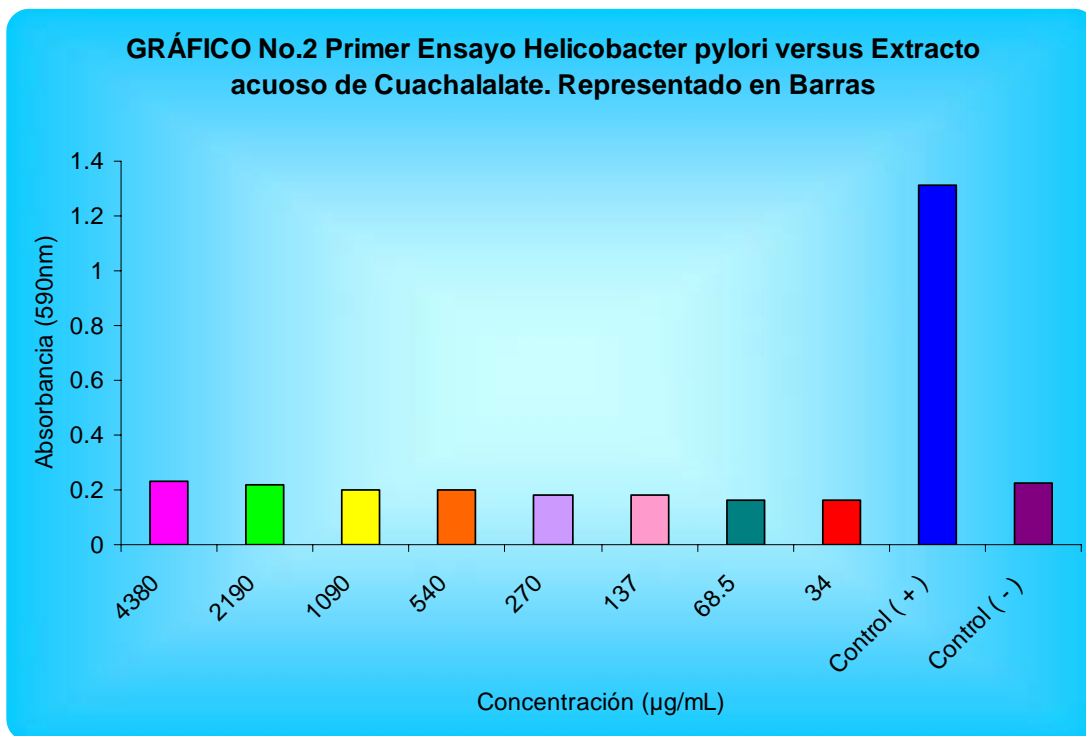
Primer ensayo de *Helicobacter pylori* versus Extracto de Cuachalalate

ABSORBANCIAS (590nm)								
CONTROL (+)	1.31	1.31	1.31	1.31	1.31	1.31	1.31	1.31
CONCENTRACIÓN	4380	2190	1090	540	270	137	68.5	34
PROBLEMAS	0.23	0.221	0.2	0.2	0.18	0.18	0.16	0.18
CONTROL (-)	0.267	0.267	0.267	0.267	0.267	0.267	0.267	0.267



En el Gráfico Número 1, se observa el comportamiento que tiene la bacteria de *Helicobacter pylori* al ensayarla con el Extracto de Cuachalalate. La Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) que se obtuvo se encuentra en la dilución 1:128 la cual corresponde a una concentración de 34µg/mL.

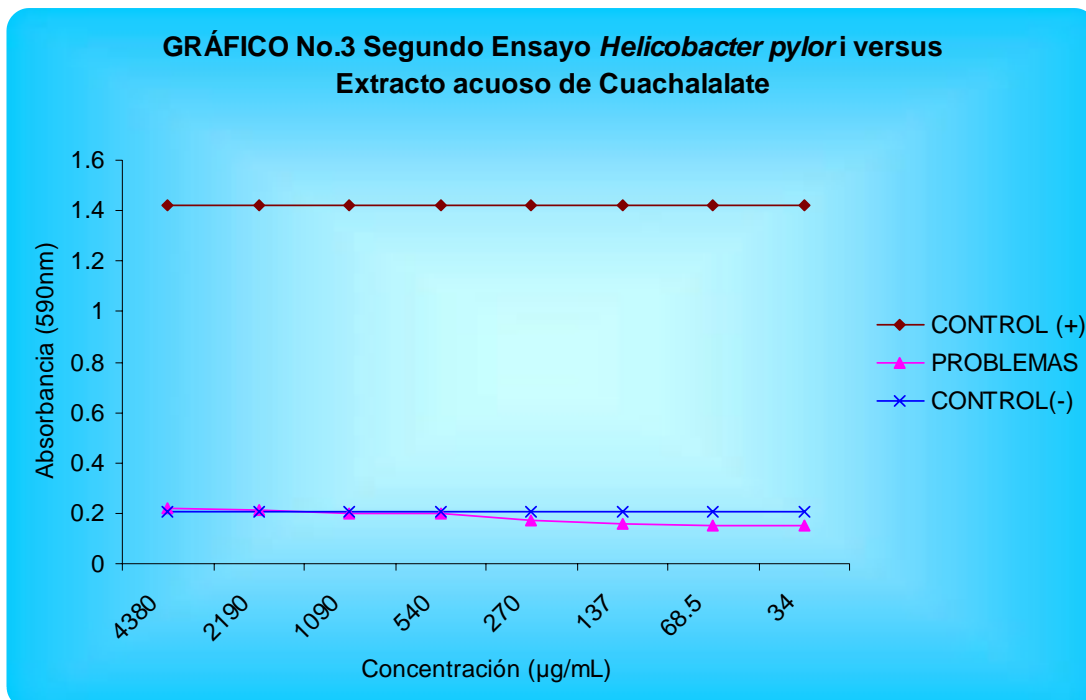
Representación en Barras del Primer ensayo de *Helicobacter pylori* versus Extracto de Cuachalalate.



Se realizó este grafico para ver el comportamiento de la bacteria con el Extracto de Cuachalalate en donde se observa que nuestro control positivo tiene una mayor absorbancia con respecto a nuestro control negativo, las absorbancias que se obtuvieron en las diferentes diluciones se encuentran por debajo del control positivo y control negativo. En este ensayo la bacteria fue inhibida en todas las diluciones realizadas.

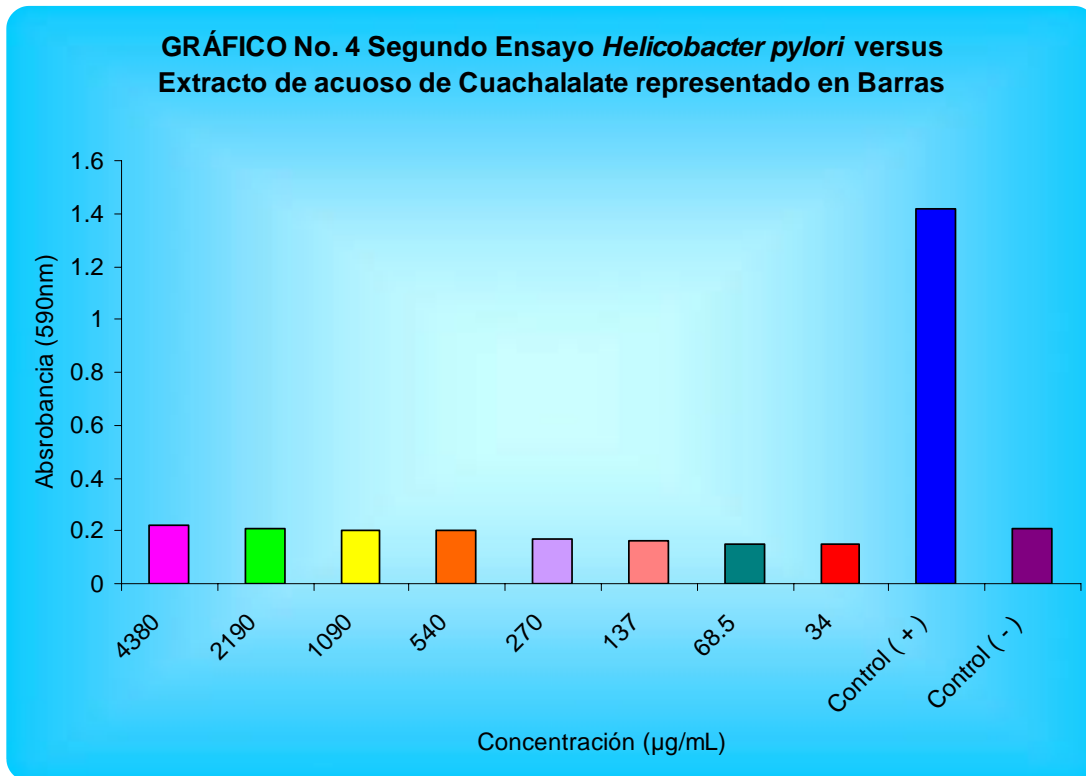
Segundo ensayo de *Helicobacter pylori* versus Extracto de Cuachalalate.

	ABSORBANCIAS (590nm)							
CONTROL (+)	1.421	1.421	1.421	1.421	1.421	1.421	1.421	1.421
CONCENTRACIÓN	4380	2190	1090	540	270	137	68.5	34
PROBLEMAS	0.22	0.21	0.2	0.2	0.17	0.16	0.15	0.15
CONTROL (-)	0.267	0.267	0.267	0.267	0.267	0.267	0.267	0.267



Aquí se muestra la conducta que tiene *Helicobacter pylori* al tratarla con el Extracto de Cuachalalate. La Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) se encuentra en la dilución 1:128 la cual tiene una concentración de 34µg/mL.

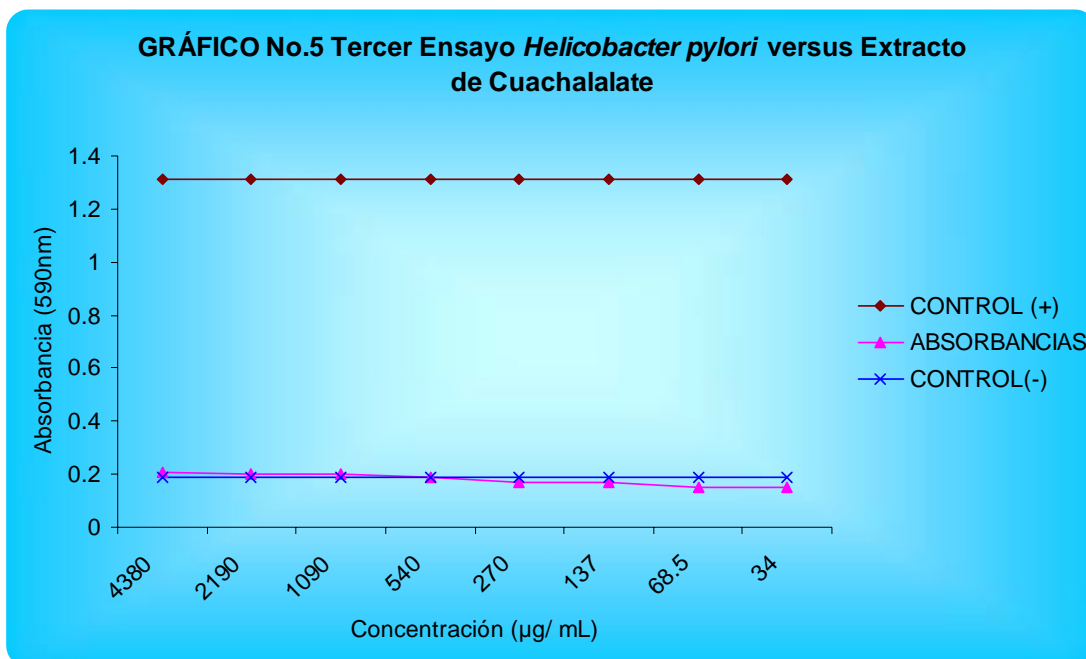
Grafico en Barras del Segundo ensayo de *Helicobacter pylori* versus Extracto de Cuachalalate.



La tendencia que tiene la bacteria al tratarla con el Extracto de Cuachalalate a diferentes diluciones; se distingue la diferencia que hay entre el control positivo con una mayor absorbancia con respecto control negativo, las absorbancias que resultaron en las diluciones realizadas están por debajo del control positivo y control negativo, por lo que tenemos que la bacteria en todas las diluciones fue inhibida.

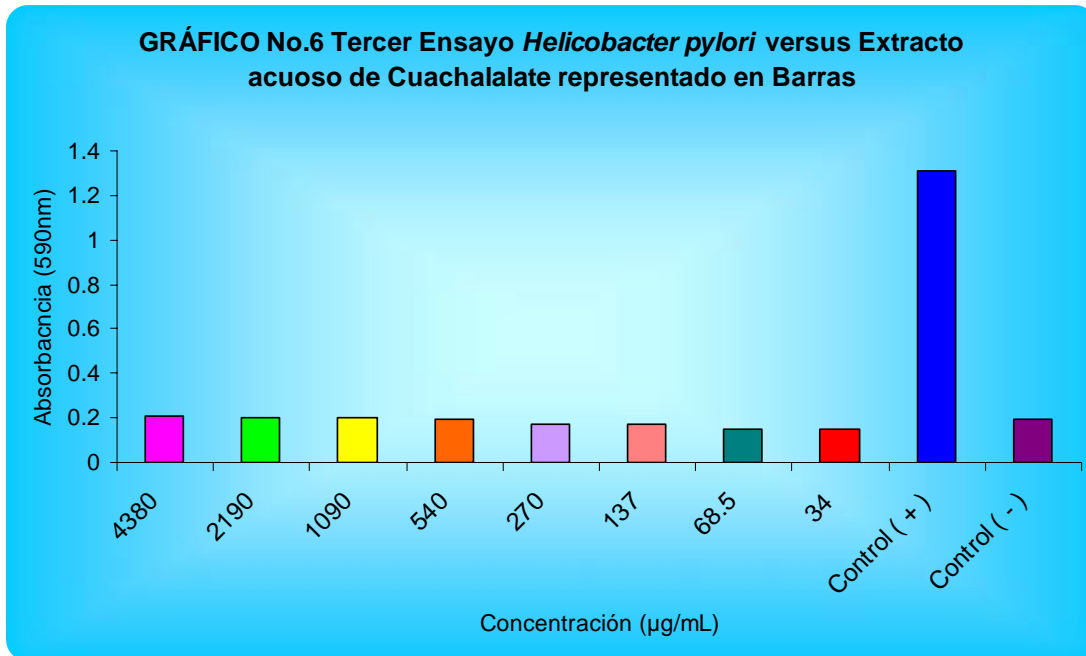
Tercer ensayo de *Helicobacter pylori* versus Extracto de Cuachalalate.

	ABSORBANCIAS (590nm)							
CONTROL (+)	1.31	1.31	1.31	1.31	1.31	1.31	1.31	1.31
CONCENTRACIÓN	4380	2190	1090	540	270	137	68.5	34
PROBLEMAS	0.21	0.2	0.2	0.19	0.17	0.17	0.15	0.15
CONTROL (-)	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19



En éste tercer ensayo se muestra que la bacteria de *Helicobacter pylori* al probarla con el Extracto de Cuachalalate. Se obtuvo una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 34µg/mL la cual se encuentra en la dilución 1:128.

Tercer ensayo de *Helicobacter pylori* versus Extracto de Cuachalalate. Representado en barras.



En ésta representación se ven las diluciones realizadas con *H. pylori* y el extracto acuoso de Cuachalalate en donde presentan una menor absorbancia con respecto al Control positivo y control Negativo. Por lo tanto se tiene una CMI de 34µg/mL.

Efecto bactericida o bacteriostático.

En esta prueba se observa el efecto bacteriostático, ya que después de un lapso de 48hrs. a 37° C el resultado del ensayo del extracto de Cuachalalate al enfrentarla con *Helicobacter pylori* se observa que en el Control Positivo hay mayor crecimiento a comparación de nuestro Problema y en el Control Negativo no hay crecimiento.

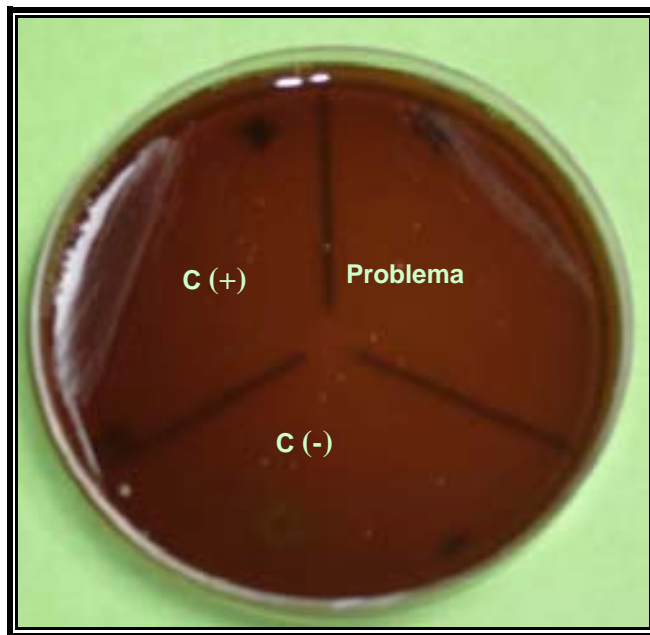


Fig.22. Resultado Bacteriostático

En la Microscopía Electrónica de Transmisión con la técnica de Tinción negativa, logramos observar la morfología de la bacteria Tratada y No tratada encontrando diferencias estructurales superficiales (Ver Fig. 23 – 24).

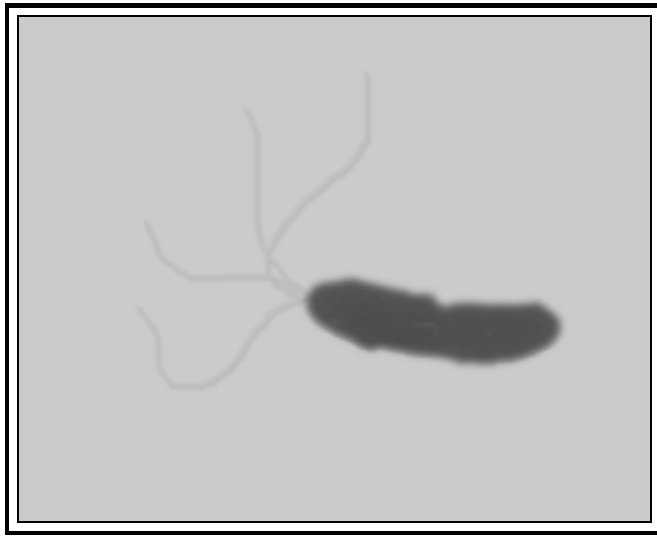


Fig. 23 *Helicobacter pylori* sin tratar. Microfotografía tomada con el Microscopio Electrónico de Transmisión a 10 000 aumentos; se observa la estructura que posee ésta bacteria; como su forma helicoidal, además presenta 4 de sus 8 flagelos en uno de sus extremos.

Fig. 24 *Helicobacter pylori* tratada con Cuachalalate. Microfotografía tomada con el Microscopio Electrónico de Transmisión a 20 000X. Se puede distinguir el daño que presenta la membrana de la bacteria después de haber sido tratada con el Extracto de Cuachalalate.



8. DISCUSIÓN

Actualmente la Medicina Tradicional ha conquistado diversos espacios importantes, rebasando incluso las fronteras entre lo étnico y lo global, lo tradicional y lo ortodoxo, lo rural y lo urbano; cada vez son más las personas que recurren a ella, no sólo pacientes, sino también médicos alópatas, investigadores e instituciones que han encontrado en este conocimiento una nueva alternativa para la búsqueda y tratamiento en los procesos de salud-enfermedad, que no sólo es reconocida por su eficacia, sino también por su reciente legitimidad científica, histórica y cultural.

La corteza de Cuachalalate ha sido utilizada para el tratamiento de la gastritis, úlcera péptica, duodenal y cáncer de estómago, ya que ésta es una planta medicinal con infinidad de propiedades farmacéuticas, por tal motivo se realizaron algunas pruebas para evidenciar el efecto antimicrobiano que tiene sobre *Helicobacter pylori*.

Helicobacter pylori es un patógeno no invasivo pero que coloniza las superficies de la mucosa gástrica, donde la respuesta del hospedador produce inflamación y es por ello el máximo responsable de gastritis, úlceras pépticas, cáncer de estómago. Se han buscado alternativas para el tratamiento así como prevención

En Julio de 2007 Castillo Juárez I.; et. al., publicaron que los ácidos anacárdicos de la corteza de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) tienen una actividad en contra de *Helicobacter pylori*. Ellos realizaron una extracción continua de Soxhlet de la corteza de Cuachalalate, identificaron de la mezcla con éter tenía actividad antimicrobiana significativa para el *H. pylori*, de ésta fracción aislaron una mezcla de los ácidos anacárdicos y tres triterpenos: ácido masticadienónico, ácido 3 α - hidroximasticandienónico, 3 epi-oleanólico, así como el esteroide β -sitosterol. Demostraron que solo la mezcla de los ácidos anacárdicos tienen una actividad antibacteriana contra *Helicobacter pylori* (MIC=10 μ g/mL)^[123]

En Estados Unidos hay una patente con número 7045156, en la cual mencionan el proceso de preparación para eliminar la bacteria *Helicobacter pylori*; en donde colocan 3 kilos de la corteza de Cuachalalate en 16 litros de agua, se coloca en una olla por 5 horas sin dejar evaporar. Después del transcurso del tiempo se filtra, la corteza se separa del líquido. Se toman 6 Litros de la nueva solución obtenida puesto que el sabor es desagradable se le coloca 1mL de mentol para que tenga mejor sabor, posteriormente se refrigera la solución hasta que se embotella para utilizarla. Las píldoras y las tabletas pueden ser hechas de la solución original. Calculando su concentración ellos tienen 18.75g/100mL, lo que nos dice que la preparación esta muy concentrada^[124]. En un trabajo realizado por Gardea S., Vera G., et. al., de 2005, demostraron que a concentraciones altas de Cuachalalate provoca citotoxicidad en las células MDBK y Vero, ellas prepararon su extracto con 1g de la corteza de Cuachalalate en 100mL de agua^[125], lo cual se observa que es menor con respecto a la que tiene la patente de Estados Unidos, nosotros tenemos es de 4.5g/100mL la cual es también baja a comparación de esa patente.

En un estudio realizado por Miranda Malvaez M. en 2006; en el que evaluó el efecto antimicrobiano de la corteza de Cuachalalate en bacterias Gram (+). Gram (-) y *Helicobacter pylori*, desarrollo un extracto acuoso estéril obteniendo una concentración de 4572.13µg/mL, en donde realizó varios ensayos en los cuales determinó que mientras el extracto se encuentre más concentrado va a inhibir a *Helicobacter pylori* obteniendo una CMI de 285.76µg/mL en unos de los ensayos que realizó como son: dilución en tubo, dilución en agar, prueba de penicilindros (o prueba de difusión en agar "cilindro-placa") y el método de Kirby-Bauer (o prueba de sensidiscos) ^[126]. Por lo que se puede decir que Ensayo de Mossman (MTT) es más sensible con respecto a las demás pruebas.

También hay trabajos en los cuales se realizan ensayos in vivo con el extracto de cuachalalate para el tratamiento de úlceras pépticas y gástricas; por ejemplo el que realizo Cubillo C. 2007; en donde se evaluó el efecto antiulceroso de la corteza de Cuachalalate; para ello se utilizaron ratas Wistar de peso promedio de 250 a 300 g; a éstas se les indujo úlcera de tipo farmacológico con una mezcla al 2% de naproxen en alcohol al 70%.

Después se les administro el té de Cuachalalate cuya concentración fue del 2.4% y en dosis graduales entre 25 y 100 mg/Kg de peso, durante 7 días para conocer la eficacia de este producto. Los resultados obtenidos mostraron que el té de Cuachalalate a la dosis de 50 mg/Kg de peso mostró el mejor porcentaje de recuperación de la úlcera péptica ya que tanto la úlcera formada en el estómago como la del duodeno muestran una mejoría del 88% en el primero y del 71% en el segundo^[127].

El extracto acuso de Cuachalalate se filtro por medio de membranas para asegurarnos que estuviera estéril y que no interfiera con los resultados. La filtración por membrana constituye un modo eficaz de lograr una calidad con una menor contaminación microbiana; la membrana funciona como una pared de separación selectiva; de esta forma al pasar el extracto de cuachalalate algunas sustancias pueden atravesar la membrana, mientras que otras quedan atrapadas en ella. No obstante, los fluidos no atraviesan las membranas porque sí, sino que requieren energía, factor que obliga a aplicar alta presión, a mantener un gradiente de concentración en ambos lados de la membrana.

La cepa fue proporcionada por el M. en C. Gerardo González Valencia del Hospital General Siglo XXI, Hospital de Pediatría en la Unidad de Enfermedades Infecciosas. Laboratorio de Bacteriología,

La bacteria se encontraba en Nitrógeno líquido para su conservación y sobrevivencia, posteriormente se sembró en medio de Agar Sangre durante 5 días a 37°C en condiciones anaeróbicas, para corroborar su identidad se realizo un frotis y se tiño con Gram, ratificando el Gram y la forma, además las pruebas de catalasa, oxidasa y ureasa las cuales fueron positivas (Ver Anexo 2).

De las lecturas obtenidas en los 3 ensayos se realizaron gráficos para observar el comportamiento que tiene la bacteria con el extracto de Cuachalalate.

En el gráfico 1 se representa el ensayo del extracto acuso de Cuachalalate contra *Helicobacter pylori*, las absorbancias obtenidas se encuentran por debajo del control positivo y control negativo en todas las diluciones; por lo tanto nuestra Concentración Mínima Inhibitoria se localiza en la dilución 1:128 la cual corresponde a una concentración de 34µg/mL partiendo de una concentración inicial de 4380µg/mL. Estamos presentando solo el gráfico 1 ya que si ponemos los gráficos 2 y 3 sería muy repetitivo hablar de ellos por la similitud de los resultados.

Por otra parte, la técnica colorimétrica rápida que emplea el colorante 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5 bromuro difeniltetrazolio (MTT), que es reducido por deshidrogenasas mitocondriales de células viables a formazan púrpura (evaluación del bioensayo) ^[128]; nos ayudo para corroborar nuestro ensayo de Concentración Mínima Inhibitoria, por ser un método cuantitativo; así como cualitativo el cual nos indica la viabilidad de las bacterias; mostrando un color amarillo para las bacterias no viables y un color violeta para las bacterias viables, en nuestra placa se obtuvo un color amarillo a partir del pozo 2 el cual corresponde a la concentración de 2.19mcg/µl, la coloración violeta que presento el pozo número 1 fue debido a la alta concentración del extracto de cuachalalate el cual causo un precipitado violeta, pero comparado con el control positivo la coloración violeta es muy baja.

En la Figura 19 se muestra la técnica de dilución en tubo realizada los resultados que obtuvimos fueron que en el tubo número 4 se observa el crecimiento de la bacteria teniendo así una CMI de 1.09µg/mL ya que en este tubo no hay crecimiento de la bacteria, esta prueba es visual por lo que a comparación del método de Mosmann se puede deducir que éste es un método más sensible que el método de dilución en tubo.

Se realizó la prueba de bactericida- bacteriostático, sembrando en Agar Sangre al 10% en condiciones anaeróbicas durante 3 días, el control positivo, el control negativo y nuestro problema; los resultados obtenidos fueron un crecimiento notable en el control positivo y un crecimiento moderado en el problema y en el control negativo no presento crecimiento (ver Anexo 2). Mostrando un efecto Bacteriostático.

Las bacterias que han sido expuestas a un factor inhibidor, al resembrarlas a un medio que carece de dicho inhibidor pueden recuperar su crecimiento indicando que el efecto del inhibidor es de tipo bacteriostático.

La estructura membranal de *Helicobacter pylori* al igual que otras bacterias Gram negativas tiene una membrana externa e interna, en la que se han identificado proteínas y lípidos. A diferencia de los lipopolisacáridos (LPS) de otras bacterias entéricas, los de *Helicobacter pylori* tienen una actividad inmunogénica débil, por lo que no hay una alta inducción de citocinas inflamatorias^[129].

Para evidenciar el daño de cuachalalate en *Helicobacter pylori* se hizo la Tinción Negativa la cual se basa en contrastar la muestra impregnándola con una sal de un metal pesado (ácido fosfotúngstico al 2%), que perfila mínimos detalles ultraestructurales sobre un fondo oscuro; de ahí su denominación como técnica de “contraste negativo”, o de tinción negativa. Los reactivos que se utilizan en esta técnica presentan las siguientes propiedades: interactúan mínimamente con la muestra y son estables en la interacción con los electrones, son altamente solubles en agua, presentan una alta densidad que favorece el contraste y tienen un punto alto de fusión.

La muestra requiere estar protegida con metales pesados para que soporten la interacción de los electrones de alta energía; Las muestras deben tener un grosor adecuado para permitir que los electrones sean transmitidos a través de la muestra y así poder tener una imagen con una buena resolución.

En la figura número 23 se puede observar la bacteria sin tratar con su morfología intacta la cual se ve como una bacteria larga en forma de espiral. *H. pylori* al ser una célula procariota contiene en uno de sus polos apéndices largos y finos que se encuentran libres en un extremo y unidos a la pared celular y a la membrana bacteriana en una zona de anclaje junto con el gancho antes de que se inicie la formación del filamento flagelar. La flagelación es de tipo polar. En uno de sus extremos forma penachos con disposición a manera de pelos denominándola flagelación lofotrópica. Presento 4 de los 6 flagelos que puede tener.

En la figura número 24 se presenta la bacteria tratada con el extracto acuoso de cuachalalate y se observa un daño en la pared de la bacteria aunque no pierde su forma espiral, en esta micrografía la bacteria ya no presenta los flagelos característicos. Aunque no se observan los esferoblastos que se deben de formar en las bacterias Gram (-), se puede apreciar el daño a nivel de membrana y pared ya que se ve el anamorfismo que tiene la bacteria al ser agredida por el Extracto de Cuachalalate. Tampoco se encontraron formas cocoides las cuales son una forma de resistencia de la bacteria.

La Microscopia Electrónica fue de mucha ayuda ya que gracias a ella se pudo observar lo que estaba pasando morfológicamente con la bacteria cuando es tratada con el Extracto acuso de Cuachalalate ya que se pudo evidenciar el daño morfológico que le provoca a *Helicobacter pylori*.

Para presenciar mejor el daño se sugeriría realizar algunas técnicas de tinción como lo realizado por Martínez Urban Carol en donde se evaluó el efecto del Extracto Etanólico de Propoleo sobre el crecimiento y el daño estructural de *Candida albicans* ATCC 1023, obteniendo una CMI de 0.6mg/mL. Hicieron diversas tinciones para la evaluación del daño estructural que el Extracto Etanólico de Propoleo le ocasiona a las levaduras con el Gram y el Azul de Toluidina se observaron alteraciones en su morfología y tamaño además de que la tinción fue parcial por lo que sugirieron que hay un daño a nivel de pared . Con la Tinción de Bromuro de etidio se evidenció un daño a nivel de membrana celular y con DAPI (4',6 Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato) el daño que obtuvieron fue a nivel de membrana nuclear ya que encontraron fluorescencia a nivel citoplasmático^[130].

El desarrollo de vacunas contra *H. pylori* se presenta como una alternativa para el control de la infección, aunque de poco impacto directo sobre la morbilidad y la mortalidad del cáncer gástrico si no se controlan otros factores ambientales involucrados en la carcinogénesis gástrica. Diversas vacunas contra *H. pylori* han sido diseñadas basadas en los principales factores de virulencia bacterianos y con la incorporación de adyuvantes de mucosa para modular la respuesta inmune contra la bacteria. Estas vacunas han sido ensayadas en modelos animales con resultados bastante prometedores, aunque los pocos estudios clínicos en humanos sugieren que aún falta mucha investigación y mejoramiento de las vacunas actualmente disponibles para que puedan ser utilizadas masivamente.^[131]

9. CONCLUSIONES

- Se aprendió el manejo microbiológico la cepa de *Helicobacter pylori*.
- El extracto acuoso de cuachalalate se esterilizó por medio de filtración por membrana.
- Con la técnica de dilución en tubo se logro conocer la Concentración Mínima Inhibitoria evidenciada con el método de Mosmann al ser un método cualitativo y cuantitativo; la CMI fue de 34µg/mL.
- Gracias a la Microscopia Electrónica de Transmisión (MET) se pudo observar la morfología de la bacteria, así como el daño que se produjo a nivel de pared celular en la bacteria tratada con el extracto acuoso de cuachalalate, la cual se evidencio con la Tinción Negativa.
- De acuerdo a los resultados obtenidos y a la bibliografía consultada; el extracto de Cuachalalate es una excelente alternativa para combatir la infección por *Helicobacter pylori* y tratar la gastritis.

10. SUGERENCIAS

- Nosotros creemos que se debe seguir trabajando con el extracto de cuachalalate para que en un futuro cercano se cuente con un tratamiento alternativo seguro y confiable para las patologías gástricas.

11. ANEXO 1

MATERIALES

Medios de cultivo en placa:

Agar Muller Hinton para la preparación de Agar Sangre, ya que no se contaba con Base de Agar Sastre para este propósito.

Medios de cultivo en tubo:

Medio Urea de Christensen (DIBICO)

Caldo BHI a doble concentración. (Diagnóstica MERCK)

Reactivos:

Aceite de inmersión

Agua destilada estéril

Cristal Violeta

Lugol

Alcohol-acetona

Safranina

Peróxido de Hidrógeno

Tira Reactiva para Oxidasa

Sobre para la generación de CO₂

Karnosky (Fijador)

Buffer de Fosfatos estéril

Ácido Fosfotúngstico

MTT (5mg/ml)

MTT (MP biomedicals, INC.) 250 mg

RPMI-1640 sin rojo de fenol (SIGMA) c.b.p 50 mL

Se esteriliza con membrana de 0.22 µm (millipore).

Conservar a 4°C en vial ámbar.

Material:

Matraces Erlenmeyer de 250, 500, 1000mL. (KIMAX)

Vidrios de reloj. (PIREX)

Cajas petri. (PIREX)

Probetas. (PIREX)

Pipetas de diferentes volúmenes. (KIMAX)

Asas bacteriológicas.

Tubos con tapón de rosca. (PIREX)

Portaobjetos.

Microplacas de fondo plano estériles de 96 pozos. (EVERGREEN)

Micropipeta de 40 a 200 μ L (OXFORD)

Micropipeta de 5 a 10 μ L (OXFORD)

Puntas para micropipeta estériles

Pipetas de 5ml estériles. (KIMAX)

Pipetas de 10 ml estériles. (KIMAX)

Palillos estériles

Mecheros Bunsen

Jarra Gas Pack

Rejillas Fomvar

Pinzas

Membranas nylon Blanco (5.0, 0.8, 0.45, 0.20 μ m) (MILLIPORE)

Papel filtro de acetato de celulosa No. 3 (WHATMAN)

Papel aluminio (WEZER)

Embudo de vidrio (PIREX)

Viales ámbar con tapón de rosca de 5mL estériles

Vasos de precipitado de 50 y 100 MI (PIREX)

Parafilm

Equipo:

Autoclave (ALL American Modelo 1925X)

Parrilla con agitador (Nuova II Stir Plate)

Microscopio Óptico (OLYMPUS)

Lector de ELISA (BIORAD)

Balanza analítica (ADVENTURE PRO)

Estufa

Horno

Centrifuga

Microscópio Electrónico de Transmisión

Bomba de vacío (G.E-Hoffman-Pinthe, modelo 0210)

Material biológico:

Amphipterygium adstringens (Cuachalalate)

Cepa de *Helicobacter pylori*

Sangre de Caballo

12. ANEXO 2

TECNICAS REALIZADAS PARA LA RATIFICACIÓN DE *Helicobacter pylori*

TINCIÓN DE GRAM

Fundamento

Clasificar taxonómicamente a las bacterias en Gram (+) y Gram (-), con base a la estructura de su pared celular. Las Gram (-) son menos permeables que las primeras debido a la existencia de lípidos en su membrana externa.

Realización

En un portaobjeto perfectamente limpio y seco, realizar un frotis de una colonia bacteriana de la siguiente manera:

- Con un asa bacteriológica de punta redonda, previamente flameada, depositar una gota de agua estéril en el portaobjetos.
- Flamear nuevamente el asa y tomar una muestra de una colonia para extenderla sobre la gota previamente depositada.
- Secar al calor de la flama proporcionada por un mechero Bunsen con cuidado de que la temperatura del portaobjetos no quemee a las bacterias.
- Agregar los siguientes reactivos en orden que se mencionan todos se eliminan al chorro de agua
 - Cristal Violeta por un minuto eliminar el exceso
 - Lugol por un minuto y eliminar el exceso
 - Alcohol - Acetona de 2 a 3 segundos
 - Finalmente Safranina 2 minutos y quitar el exceso de colorante.
- Observar el frotis teñido en un microscopio óptico (OLYMPUS®)CH2) en un objetivo de 100x

Interpretación

Con ésta tinción se puede distinguir la forma y agrupación bacteriana. Si las bacterias se observan de color violeta, se dice que es Gram (+) pero si son de color rojo son Gram (-).

PRUEBA DE CATALASA

Fundamento

Determinar la capacidad de una bacteria para desdoblar el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno por medio de la enzima catalasa.

Realización

- En un portaobjetos perfectamente limpio y seco, poner una gota de peróxido de hidrogeno
- Tomar con un palillo estéril una muestra de una colonia bacteriana y ponerla en el peróxido de hidrogeno.

Interpretación

La formación de burbujas indica un resultado positivo. La ausencia de burbujas indica un resultado negativo.

OXIDASA

Fundamento

Determinar si una bacteria produce la enzima oxidasa intracelular, la cual participa dentro de la cadena respiratoria (sistema Citocromo Oxidasa)

Realización

- Tomar una tira estéril para oxidasa impregnada con Tetrametil-p-fenilendiamina.
- Tomar un poco de la colonia con la tira.

Interpretación

La aparición de un color morado en la tira, máximo a los 10 segundos, indica un resultado positivo. Si no aparece ningún color o aparece después de los 10 segundos, el resultado es negativo.

UREASA DE CHRISTENSEN

Fundamento

Determinar la capacidad de un microorganismo de hidrolizar la urea en 2 moléculas de amonio por acción de la enzima ureasa con la resultante alcalinidad.

Realización

- Tomar un tubo de Urea de Christensen
- Crecimiento proveniente de un cultivo puro de 72 horas
- Tomar un inóculo denso, estriar toda la superficie de pico de flauta
- No punzar el fondo; sirve como control de color

Interpretación

Positivo (+): Color rosa-rojo (rojo-violeta intenso) en el pico de flauta. El color puede penetrar en el interior del agar, la extensión del color indica la velocidad de la hidrólisis de la urea.

Negativo (-): Sin cambio de color.

RESULTADOS DE LA CONFIRMACIÓN DE *Helicobacter pylori*

PRUEBA BIOQUÍMICA	RESULTADO
GRAM	Gram (-) , de forma helicoidal de S, V o bastón curvo
CATALASA	+
OXIDASA	-
UREA DE CHRISTENSEN	+ Color rosa – rojo en todo el pico de flauta

Tabla No. 9 Resultados de las pruebas bioquímicas

TINCIÓN DE GRAM

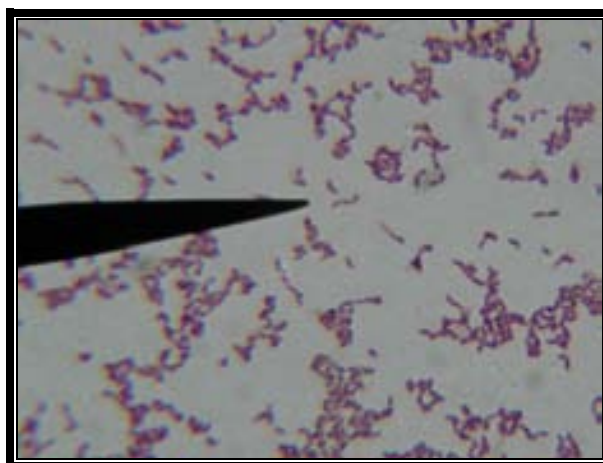


Fig. 25 Gram (-)

CATALASA



Fig. 22. Prueba de Catalasa (+)

OXIDASA



Fig. 26. Prueba de Oxidasa (+)

UREA DE CHRISTENSEN



Fig. 27 Prueba Urea de Christensen (+)

BIBLIOGRAFÍA

1. <http://digestive.niddk.nih.gov/spanish/pubs/yrdd/index.htm>
2. http://www.laescolar.com/frame_builder.html
3. http://www.kidshealth.org/parent/en_espanol/general/digestive_esp.html
4. <http://www.drgastongonzalez.com.mx/enfermedades/9.pdf>
5. <http://www.drgastongonzalez.com.mx/enfermedades/19.pdf>
6. <http://www.medicosecuador.com/espanol/articulos144.htm>
7. <http://www.drgastongonzalez.com.mx/enfermedades/3.pdf>
8. http://www.aegastro.es/Info_Paciente/Images/carren.gif
9. Warren JR. *The Discovery and Pathology of Helicobacter pylori*. In *Xth Int. Workshop on Gastrointestinal Pathology and Helicobacter pylori: The Logic of Eradication*. P.7-13, 1997 Lisboa-Portugal.
10. Anonymous. 1994. *Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori*. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 61:1–241.
11. Dunn, Bruce E. et. al; *Helicobacter pylori*; Microbiology Reviews; (1997), Vol. 10; No. 4; p.720 - 741
12. Yoshiyama H, Nakazawa T. *Unique mechanism of Helicobacter pylori for colonizing the gastric mucus*. Microb. Infect 2000; 2:55-60.
13. <http://www.infek.lu.se/bakt/english/picture1.htm>
14. <http://www.biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap11/>
15. Jawetz Melnick y Adelberg; *Microbiología Médica* ; 15ª Ed.; p. 279 – 281. 1996
16. Murray P. R. and Berron E. J.; *Manual of Clinical Microbiology*; 6ª Ed.; p. 492– 496. ; 1994.
17. Rivas Rosales Xochitl; *Evaluación in vitro de la actividad inhibitoria contra Helicobacter pylori de nuevos derivados del ácido carbámico y en combinación con nitazoxamida, amoxicilina y metronidazol*; Tesis Profesional Q.F.B.; FES Cuautitlán, 2005, UNAM.
18. Marshall B. J., Amstrong J. A., Mc Gechie D.B., et. al.; *Attemp to fulfill Koch's postulate for Campylobacter pylori*; Med. J. Aust. 1985; 142:436-439.

19. Mobley Harry LT, Mendz George L, Hazell Stuart; *Helicobacter pylori Physiology and Genetics*. Ed. ASM PRESS; Washington, D.C; 2001 USA Pag. 28
20. Moran A. P and Wadstroin T; *Bacterial pathogenic factors; The year in Helicobacter pylori*; 1994; Pag. 17- 19.
21. Boren T, Normark S, Falk P. *Helicobacter pylori: molecular basis for host recognition and bacterial adherence*. Trends Microbiol 1994; 2: 221-8.
22. Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, et al. *Clinical relevance of the Helicobacter pylori gene for blood-group antigen-binding adhesin*. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 96: 12778-83.
23. Yu J, Leung W, Go M GO, Cjhan M, To K, Ng E, et al. *Relationship between Helicobacter pylori babA2 status with gastric epithelial cell turnover and premalignant gastric lesions*. Gut 2002; 51: 480-4.
24. Alves O, Santos A, Becattini G, Aguiar R, Carmargos R, Oliveira C, et al. *babA2- and cagA Positive Helicobacter pylori Strains Are Associated with Duodenal Ulcer and Gastric Carcinoma in Brazil*. J Clin Microbiol 2003; 41: 3964-6.
25. Goossens H, Lupezynski Y, et al; *Role of the vacuolating toxin from Helicobacter pylori in the pathogenesis of duodenal and gastric ulcer*; Med. Microbiol. Lett; 1992; 1: 153-159
26. Owen RJ; Hurtado A, et al ; *Conservation of the cytotoxin-associated (cagA) gene of Helicobacter pylori and investigation of association with vacuolating-cytotoxin activity and gastroduodenal disease*, FEMS Immunol. Med. Microb.; 1994; 9:307-316.
27. Cover TL, Tummury MR, Cao P, et al; *Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among Helicobacter pylori strains*, J. Biol. Chem., 1994; 269:10566-10573.
28. Eaton KA, Brooks CL, Morgan DR, Krakowka S. *Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by Helicobacter pylori in gnotobiotic piglets*. Infect Immun 1991; 59:2470-5.
29. http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lcf/marques_m_ad/capitulo1.pdf
30. Hu LT, Mobley HLT. Purification and N-terminal analysis of urease from *Helicobacter pylori*. Infect Immun 1990; 58:992-8.
31. Mobley HLT. *The Role of Helicobacter pylori urease in the pathogenesis of gastritis and peptic ulceration*. Aliment Pharmacol Ther 1996; 10 (suppl.):57-64.

32. Clayton CL, Pallen MJ, Kleanthous H, Wren BW, Tabaqchali S. *Nucleotide sequence of two genes from Helicobacter pylori encoding for urease subunits.* Nucl Acids Res 1990; 18:362.
33. Labigne A, Cussac V, Courcoux P. *Shuttle cloning and nucleotide sequences of Helicobacter pylori genes responsible for urease activity.* J Bacteriol 1991; 173:1920-31.
34. Barer MR, Elliot TSJ, Berkeley D, Thomas JE, Eastham EJ. *Intracellular vacuolization caused by the urease of Helicobacter pylori.* J Infect Dis 1990; 161:1302-4.
35. Tummuru, M.K., Cover, T.L. and Blaser, M.J. (1993) *Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of Helicobacter pylori: evidence of linkage to cytotoxin production,* Infect. Immun. 61, 1799–1809
36. Censini, S. et al. (1996) *Cag, a pathogenicity island of Helicobacter pylori, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors,* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93, 14648–14653
37. Münzenmaier, A. et al. (1997) *A secreted/shed product of Helicobacter pylori activates transcription factor nuclear factor-kappa B,* J. Immunol. 159, 6140–6147
38. Hazell SL, Evans DJ, Graham DY. *Helicobacter pylori catalase.* JGM, 1991;137:102-6.
39. Slomiany BL, Bilski J, Sarosiek J. *Campylobacter pyloridis degrades mucin and undermines gastric mucosal integrity.* Biochem Biophys Res Commun 1987;144:307-14.
40. Langton SR, Cesareo SD. *Helicobacter pylori associated phospholipase A2 activity: a factor in peptic ulcer production?* J Clin Pathol 1992;45:221-4.
41. Wallace JL. *Lipid mediators of inflammation in gastric ulcer.* Am J Physiol 1990;(61):258.
42. Dobrilla G. *Helicobacter pylori. Mecanismos patogénicos. En: Helicobacter pylori. Patogenia.* Curso de perfeccionamiento profesional. Aparato Digestivo. Barcelona: Fundación Promedio-Promoción Médica, 1995:11-30.
43. Denizot Y, Sobhani I, Rambaud JC, Lewin M, Thomas Y, Benveniste J. *PAF-acether synthesis by Helicobacter pylori.* Gut 1990;31:1242-5.
44. Mai U, Pérez-Pérez GI, Wahl LM, Wahl SM, Blaser MJ, Smith PD. *Soluble surface proteins from Helicobacter pylori activate monocytes/macrophages by lipopolysaccharide-independent mechanism.* J Clin Invest 1991;87:894-900.

45. Taylor NS, Hasubski AT, Fox JG, Lee A. *Haemagglutination profiles of Helicobacter pylori species that causes gastritis in man and animals*. J Med Microbiol 1992; 37:299-303.
46. Dorrell N, Crabtree JE y Wren B. W. *Host-bacterial interactions and the pathogenesis of Helicobacter pylori infection*. Trends in microbiology. 1998; 6(10):379-383.
47. Loffeld RJLF, Stobberingh E. *Helicobacter pylori and ABO blood groups*. J Clin Pathol 1991; 44:516-7.
48. <http://www.clarin.com/diario/2005/10/04/info30.jpg>
49. Reyes León Adriana, *Presencia de los genes cagA, picB e iceA en colonias de Helicobacter pylori aisladas de niños y adultos con enfermedad ácido péptica*; Tesis Profesional; QFB; FES-Cuautitlán, 2000; UNAM.
50. Torres Javier, Yelda LH, et al; *A community-based seroepidemiologic study of Helicobacter pylori infection in México*; The J. of Infec. Diseases; 1998; 178:1089-1094.
51. http://www.helico.com/h_epidemiology.html
52. Cave DR. *How Helicobacter pylori is transmitted?*; Gastroenterology 1997; 113:s9-s14.
53. Cullen DJE, Collin BJ, Christiansen BJ et al. *When is bacterial Helicobacter pylori infection acquired?* Gut 1997;34:1861-2.
54. Axon ATR. *Transmission of Helicobacter pylori*. Yale J Biol Med 1997; 70:1-6.
55. Li CF, Ha TZ, Ferguson DA, et al. *A newly developed PCR assay of Helicobacter pylori in gastric biopsy, saliva and faeces. Evidence of high prevalence of Helicobacter pylori in saliva support oral transmission*. Digest Dis Sci 1996; 41:2142-9.
56. Ferguson Da LIC, Patel NR, Mayberry WR, Chi DS, Thomas E. *Isolation of Helicobacter pylori from saliva*. J Clin Pathol 1993; 31:2802-4.
57. Axon ATR. Review Article: *is Helicobacter pylori transmitted by the gastro-oral route?* Aliment Pharmacol Ther 1995; 9:585-8.
58. Akamatsu T, Tabata K, Hirong M, Kawakami H, Uyeda M. *Transmission of Helicobacter pylori infection via flexible fiberoptic endoscopy*. Am J Infect Control 1996; 24:396-401.

59. Talley JN, Noack KB. *The worldwide prevalence of Helicobacter pylori infections In: Helicobacter pylori. Biology and clinical practice.* Goodwin CS, Worsley BW, ed. London: PCR Press; 1993. p. 63
60. Notarnicola N, Russo F, Cavallini A, et al. *PCR identification of Helicobacter pylori DNA faeces from patient with gastroduodenal pathology.* Med Sci Res 1996; 24:785-7
61. Hulten K, Enroth H, Nystrom T, Engstrand L. *Presence of Helicobacter pylori in Swedish faeces of patients with dyspepsia in the United Kingdom.* J Appl Microbiol 1998;85:282-6.
62. Grubel P, Hoffman JS, Chong FK, Burstein NA, Mepani C, Cave DR. *Vector potential of houseflies (Musca domestica) for Helicobacter pylori.* J Clin Microbiol 1997; 35: 1300-3.
63. Grubel P, Cave DR. *Sanitation and houseflies (Musca domestica) for the transmission of Helicobacter pylori.* Bull Inst Pasteur 1998; 96:83-91.
64. Schmitt W., Haas R., *Cloning and genetic characterization of the Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin gene.* Acta Gastroenterol Belg.; 1993; 56(suppl):105.
65. Lopez Brea M y Col., Correa P, Skirrow MB, Marshall BJ; *Helicobacter pylori . Retos para el siglo XXI*, en [línea] sep. 2004 [fecha de ingreso 15 de septiembre de 2004] URL disponible en <http://www.helicobacterspain.com/index800.htm>
66. Helmann KL, Borchard F, *Gastritis due to spiral shaped bacteria Tower than Helicobacter pylori: clinical, histological and estructural findings.* Gut 1991; 32:137-140.
67. Glupczynski Y. *The diagnosis of Helicobacter pylori infection: A microbiologist's perspective.* Reviews Medical Microbiology 1994; 5:199-208.
68. Hernández F, Rivera P. *A low cost method to produce a gaseous environment for the isolation of Helicobacter pylori.* Rev Inst Trop Med Sao Paulo 1992; 33:80.
69. Kodaka H, Armfield AY, Lombard GL, Dowel VR. *Practical procedure for demonstrating bacterial flajellae.* J Clin Microbiol 1989;16: 948-52
70. Ferrándiz Santos J, Romero A, *Helicobacter pylori.* [en línea] marzo 1999 [fecha de ingreso 23 de septiembre de 2004] URL disponible en: <http://www.cap.semfycc.com/sesclin/sc0012/sc0012htm>
71. Marshall BJ. *Helicobacter pylori.* Am J Gastroenterol 1994; 89:116-128.
72. Schell GA, Schubert IT. *Usefulness of culture, histology and urease testing in the detection of Campylobacter pylori.* Am J Gastroenterol 1989; 84:133-137

73. Cadranel S. Corvaglia L, Botems P, et al. *Detection of Helicobacter pylori infection in children with standardized and simplified 13C-ure breath test.* J Pediatr Gastroenterol Nutr 1998; 27: 275-80
74. Guerrero Olea; *Determinación de la concentración mínima inhibitoria de nuevos derivados del ácido carbámico contra Helicobacter pylori*; Tesis Profesional Q.F.B.; FES-Cuautitlán; 2002; UNAM.
75. Solano Méndez M.V; *Efecto antimicrobiano de los extractos metanólicos de Aristolochia grandiflora y Aristolochia littoralis*; Tesis Profesional Q.F.B.; FES-Cuautitlán; 1995; UNAM.
76. Bergoglio, Remo M.; Antibióticos; 5ª ed.; Ed. Médica Panamericana.
77. Goodman-Gilman A. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*; 6ª ed.; Ed. Panamericana; México; 1990; p.p 150-170.
78. Farran E.W.; *Bacterial resistance. Antibiotic and Chemotherapy.* 6a. ed.; Ed. Londres Churchill Livingstone; 1992; pp. 303-312.
79. http://danival.org/600%20microbio/6200microclin/antibiot/_madre_antibiot.html
80. Cordiés Jackson L.; Vázquez Vigoa A.; *Principios generales de la terapéutica antimicrobiana.*
81. Graham D.Y. de Boer, W.A., Tytgat G, et al. *Choosing the best anti-Helicobacter pylori therapy: effect of antimicrobial resistance.* Am J gastroenterol. 1996; 91:1072-1076.
82. Ramo González Carolina María Antonieta; *Actividad citotóxica que presentan los sobrenadantes de cepas de Helicobacter pylori obtenidas de adultos con gastritis crónica y úlcera duodenal.* Tesis Profesional; Q.F.B.; FES- Cuautitlán; 2000.UNAM.
83. Martínez Sánchez G.; Saperas E., et. al; *Actitud de los médicos de atención primaria del área metropolitana de Barcelona frente al diagnóstico y tratamiento de la infección por Helicobacter pylori en enfermedades gastroduodenales,* Gastroenterol Hepatol 1999; 21:473-478.
84. Janssen M.J.R, Van Oijen A. H.; et al. *A systematic comparison of triple therapies of treatment of Helicobacter pylori infection with proton pump inhibitor/ranitidine bismuth citrate plus clarithromycin and either amoxicillin or nitroimidazole.* Aliment Pharmacol Ther 2001; 15:613-624.
85. Tankovic J., Lamarque D., et al. *Impact of Helicobacter pylori resistance to clarithromycin on the efficacy of the omeprazole-amoxicillin-clarithromycin therapy;* Aliment Pharmacol Ther.; 2001; 15:707 – 713.
86. O'Morain C.; Montague S. *Challenges to therapy in the future.* Helicobacter 2000; 5 (Suppl 1):23-6.

87. Reyes González Rocío; *Evaluación de la actividad antibiótica del compuesto LQM996 en Meriones unguiculatus infectado con Helicobacter pylori*; Tesis Profesional; Q.F.B, FES-Cuautitlán, 2007; UNAM.
88. <http://www.16deabril.sld.cu/apuntes/mnt/medicina%20herbolaria.html>
89. http://whqlibdoc.who.int/hq/2000/WHO_EDM_TRM_2000.1.pdf
90. Mendoza Patiño, Nicandro, et al. *Herbolaria*; Rev Fac Med; Vol. 48; 2005; p.p 248–250.
91. Zamudio Lara; L. A. *Estudio hemero-bibliográfico del cuachalalate Amphypterygium adstringens en forma de fitofármaco*. Tesis Profesional; Q.F.B.; FES-Cuautitlán; 2005;UNAM.
92. <http://www.imss.gob.mx/INR/rdonlyres/3FC1286D-83CE-4EA7-83DE-F7559BF0788A/12704/Dr.JaimeTortoriello.doc.doc>
93. Murray, Michael N.D y Pizzorno, Joseph N.D, *Enciclopedia de medicina natural*, España: Tutor, 1997, p.523.
94. Enciclopedia de medicina natural, Valle de México, 1V, pp.66-68.
95. <http://www.cucba.udg.mx/new/informacionacademica/coaxican/herbolaria/cuachalalate.htm>
96. Solares Arenas, Fortunato; Soto Hernández, Marcos y Cervantes Sánchez, Martha, *Estudio químico-biológico para la producción sostenida de corteza de cuachalalate con fines de uso farmacéutico-industrial en el estado de Morelos* [en línea], dirección electrónica: <http://www.fundacionmorelos.org.mx/Investigacion/inv/PAG-f1.htm>, 19 agosto 2004.
97. Zacarías Soto, Magali del Rosario, *Estudios preliminares del efecto fungicida del cuachalalate (Amphipterygium adstringens) y de la cancerina (Himiangium excelsum)*, Universidad Nacional Autónoma de México, Tesis Profesional, 1993, pp.11-12, 14-16, 31, 45.
98. Villar del Fresno, Angel M^a, *Farmacognosia general*, España: Síntesis, N^o 11, 1999, p.26.
99. Aguirre Alcántara, María Teresa, *Estudio farmacológico del efecto antiulcerogástrico de una fracción pura de la planta Juliania adstringens*, Universidad Nacional Autónoma de México, Tesis Profesional, 1983, pp.17-19, 52-55.
100. Conzatti, Cassiano, *Flora taxonómica mexicana*, México : Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, 1988, 1V, p.723.

101. Zamora Tirado, Paula Erika, *Evaluación del aprovechamiento potencial del cuachalalate (Amphipterygium adstringens Schiede ex Schlecht) en San Juan Bautista Jayacatlán, Oaxaca*, Universidad Nacional Autónoma de México, Tesis Profesional, 2003, pp.5, 9, 11, 14-16, 23-25, 34, 42
102. www.cib.uaem.mx/agebiol/bol_junio_julio2004.htm
103. Linares M. Bye y R. Flores B. *Plantas Medicinales de México usos y remedios tradicionales*; Instituto de Biología UNAM. 1999.
104. Sociedad Botánica de México. *XV Congreso Mexicano de Botánica. Conservación y Manejo de Recursos*. <http://www.socbot.org.mx/resumenes/resumen656.html>
105. Argueta Villamar, Arturo “y otros”, *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana*, México: Instituto Nacional Indigenista, 1994, 1V, p.58.
106. Instituto Nacional Indigenista. *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana I*. México, 1994.
107. Lara, O. F. y C.M. Alonso. *Plantas medicinales de México: Composición, usos y actividad biológica*. UNAM; México 1996.
108. <http://www.univision.com/content/content.jhtml;jsessionid=UXSRKFYVA0BCCCWIA BJSFEYKZAAGAIWC?cid=4974>
109. Lara, O. F. y C.M. Alonso. *Plantas medicinales de México: Composición, usos y actividad biológica*. UNAM; México 1996.
110. Boletín de la Academia General de Biología, Cuernavaca, Morelos; No. 10 y 11; Junio – Julio 2004. http://www.cib.uaem.mx/agebiol/bol_junio_julio2004htm
111. Navarrete A.; *Estudio Químico y pruebas farmacológicas preeliminares de la corteza de Julianeia adstringens (Cuachalalate)*; Tesis Profesional. Q.F.B.; ENEP Zaragoza; 1982, UNAM.
112. García González K. Y.; *Principales usos y acciones farmacológicas del Cuachalalate (Amphipterygium adstringens Schiede ex Schltedl)*. inFARMate, año 2; No. 7, Mayo – Junio. 2006.
113. <http://www.cucba.udq.mx/new/informacionacademica/coaxican/herbolaria/cuaachalalate.htm>
114. Olivera Ortega, A. G., M Soto Hernández, et. Al; *Phytochemical study of cuachalalate (Amphipterygium adstringens Schiede ex Schlecht)*. J. Ethopharmacol. 68, 109-113.
115. Martínez Fuentes Daniel. *Evaluación farmacológica de la acción antiulcerosa del a infusión de la corteza de Cuachalalate (Amphypterygium adstringens) procedente de Puebla*. Tesis Profesional. Q.F.B. FES-Cuautitlán. UNAM.2005.

116. Navarrete A. et. al; *Evaluación farmacológica de la actividad antiulcerosa de Amphypterygium adstringens (Cuachalalate)*; Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas; 1990; 21:28-32.
117. Quintanar D. Ávila J; Arroyo G.; *Estudio de las propiedades fotoprotectoras-cosméticas del extracto de Amphypterygium adstringens (Cuachalalate)*. Ciencia cosmética; 1994; 1:16-17.
118. http://www.teorema.com.mx/articulos.php?id_sec=54&id_art=1457
119. González Gallardo Sofía, Ruiz Venegas María Rosario, Hernández Baumgarten Eliseo Manuel, *Guía de Microscopía Electrónica*; Universidad Nacional Autónoma de México; Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Octubre 2003; Pág. 15, 25, 27.
120. Lemos Pastrana A; *Microbiología General*; Pág...33, Departamento de Microbiología Escuela Nacional de Ciencias Biológicas; IPN; Ed. CD Derechos Reservados. 2005.
121. Jurado Susana; Petruccelli M.A.; *Aplicaciones de la microscopía electrónica de transmisión en el diagnóstico microbiológico*; Analecta Veterinaria; 2005; (1): 18-24.
122. Hernández Zamora Sonia; *Efecto sinérgico y/o antagónico de Quitosán y extracto de Caléndula officinalis en bacterias asociadas a infecciones de heridas en humanos*; Tesis Profesional. Q.F.B. FES-Cuautitlán. UNAM.2007.
123. Castillo Juárez, I.; Rivero Cruz F, et al. *Anti-Helicobacter pylori activity of anacardic acids from Amphypterygium adstringens*. Journal of Ethnopharmacology; 114 (2007) 72-77.
124. <http://www.patentstorm.us/patents/7045156/fulltext.html>
125. Gardea García, Vera Viviano; *Determinación del efecto citotóxico y/o inductor de proliferación celular de Caléndula officinalis y Amphypterygium adstringens en dos líneas celulares evidenciado por el método colorimétrico de Mosmann*. Tesis Profesional; Q.F.B, FES-Cuautitlán, 2006; UNAM.
126. Miranda Malvaez M.; *Efecto antimicrobiano del extracto acuoso de cuachalalate (Amphypterygium adstringens) en bacterias Gram(+), Gram (-) y Helicobacter pylori*. Tesis Profesional; Q.F.B, FES-Cuautitlán, 2006; UNAM.
127. <http://www.canifarma.org.mx/eventos/premio2007/Resumenes2007.pdf>
128. Mosmann T. *Rapid colorimétrico assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay*. J. Immunol. Methods. 1983.
129. Alberto Ramírez Ramos y Robert H. Gilman. *Helicobacter pylori en el Perú*. Profesores investigadores de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. 2001

<http://www.monografias.com/trabajos60/helicobacter-pylori/helicobacter-pylori2.shtml>

130. Martínez Urban C.; *Efecto del extracto etanólico de propóleo sobre el crecimiento y el daño estructural de Candida albicans*. Tesis Profesional; Q.F.B., FES-Cuautitlán, 2006; UNAM.
131. García, Fernando. *Vacunas contra Helicobacter pylori: ¿Una alternativa con impacto global contra el cáncer gástrico?*. *Rev. costarric. salud pública*, dic. 2002, Vol.11, no.21, p.32-36. ISSN 1409-1429.