



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE MEDICINA

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Estudio de la actividad anti-*Helicobacter pylori* de la  
corteza de *Amphipterygium adstringens*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A:

BIOL. ISRAEL CASTILLO JUÁREZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. IRMA ROMERO ÁLVAREZ



2011



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 MEDICINA



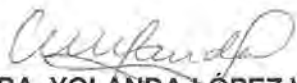
PDCB/grad/ 052Jur/2010

**DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ**  
**DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN**  
**ESCOLAR, UNAM**  
Presente.

Nos permitimos informarle que con base al Artículo 31 del RGEPE el Comité Académico de **DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**, en su reunión 269ª del 20 de octubre de 2010, designó el siguiente jurado para examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** de **ISRAEL CASTILLO JUAREZ**, con número de cuenta **9534003-2**, con la tesis titulada **"ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTI-HELICOBACTER PYLORI DE LA CORTEZA DE AMPHIPTERYGIUM ADSTRINGENS"**, dirigida por la Dra. Irma Romero Alvarez.

Presidente: Dr. Mariano Martínez Vázquez  
Secretario: Dra. Bertha María J González Pedrajo  
Vocal: Dra. Yolanda López Vidal  
Vocal: Dra. Martha Lydia Macias Rubalcava  
Vocal: Dra. Guadalupe Ayala Aguilar

Atentamente  
*"Por mi raza hablará el espíritu"*  
Cd. Universitaria, a 20 de octubre de 2010.

  
**DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL**  
**RESPONSABLE**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

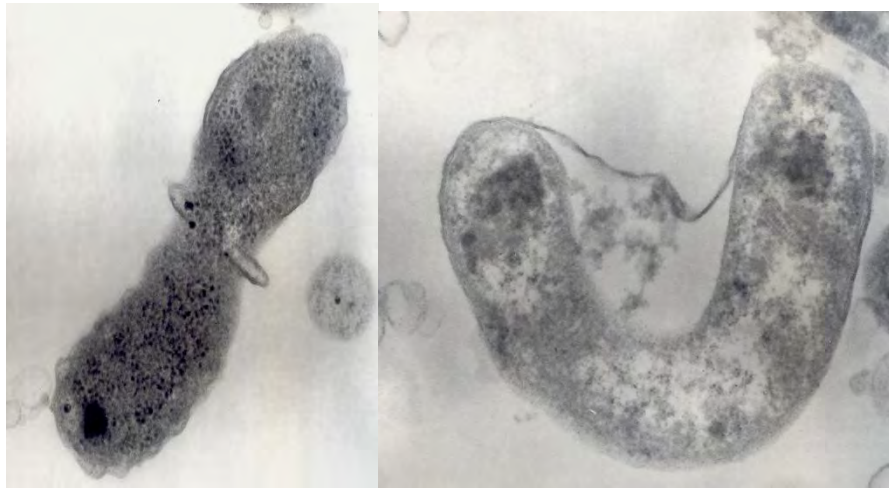
  
**DR. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES**  
**COORDINADOR DEL PROGRAMA**

C.c.p Lic. Balfred Santaella Hinojosa, Coordinador de la Unidad de Administración Escolar del Posgrado, UNAM  
Tutor (a) Dra. Irma Romero Alvarez.  
Coordinación de PDCB

MMF/YLV/evb

Teléfono 5623 0171 5623 0170 <http://www.pdcb.unam.mx> E-mail: [pdcb@servidor.unam.mx](mailto:pdcb@servidor.unam.mx)

**A mi esposa Marcela y a nuestros hijos Diego y Emilio. A María mi madre y a mis  
hermanos Arisaí y Abraham. A mis amigas Silvia y Rebeca.**



## **AGRADECIMIENTOS.**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Medicina, así como al Doctorado en Ciencias Biomédicas y al CONACyT. A DGAPA-UNAM por el donativo PAPIIT IN-218108.

A mi comité tutorial Dra. Bertha González Pedrajo, Dra. Irma Romero Álvarez, Dr. Heliodoro Celis Sandoval; así como a la Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava.

A los miembros del jurado, Dr. Mariano Martínez Vázquez, Dra Bertha González Pedrajo, Dra. Yolanda López Vidal, Dra. Martha Macías Rubalcava y Dra. Guadalupe Ayala Aguilar.

Así también a los que colaboraron en la realización de este trabajo: Dra. Rachel Mata Essayag, Dr. Heliodoro Celis Sandoval, Dr. Fausto Rivero Cruz, M en C. Edelmira Linares Mazarí, Dr. Robert Bye Boettler, Dra. Libia Vega Loyo, Dra. Graciela Castro Escarpulli, MC. Adrian Rangel Vega, MVZ. Mario Soriano Bautista, Dr. Adolfo Andrade Cetto, M en C. Eddy Martínez Zurita, Dr. Ernesto Trens Flores, Dr. Guillermo Mendoza Hernández, Biol. Violeta González Robledo, Biol. Héctor Jaime Aguilar, Biol. Beatriz Reyes García, Biol. Gisela Martínez García, Dra. Norma Velázquez Guadarrama, Dr. Andrés Castell Rodríguez, Dra. Guadalupe Ayala Aguilar, Dra. Martha Macías Rubalcava, MC. Rodolfo Paredes y muy en especial a la M en C. Silvia Escobedo Martínez.

## ÍNDICE.

Abreviaturas.	9
Resumen.	10
<b>1. Introducción.</b>	
1.2. <i>Helicobacter pylori</i> .	11
1.3 Patogenicidad.	11
1.4. Métodos de diagnóstico.	13
1.5. Esquemas de erradicación.	15
1.6. Modo de acción y resistencia a antibióticos.	17
1.7. <i>H. pylori</i> en México.	19
1.8. Hacia un mejor entendimiento de la bacteria <i>H. pylori</i> .	20
1.9. <i>H. pylori</i> ¿patógeno o biota natural del humano?.	24
1.10. ¿Qué determina que <i>H. pylori</i> cause enfermedad?.	26
1.11. Estudios de plantas con actividad inhibidora del crecimiento de <i>H. pylori</i> .	27
1.12. <i>Amphipterygium adstringens</i> “cuachalalate”.	32
<b>2. Objetivos.</b>	
2.1. Objetivo general.	39
2.2. Objetivos particulares.	39
<b>3. Materiales y métodos.</b>	
3.1. Material vegetal.	40
3.2. Muestras de referencia de la corteza de <i>A. adstringens</i> .	40
3.3. Análisis cromatográficos.	40
3.4. Análisis espectrométricos y espectroscópicos.	41
3.5. Microorganismos y condiciones de cultivo.	41
3.6. Gerbos de Mongolia y ratones.	43
3.7. Métodos de extracción y separación de compuestos para la corteza de <i>A. adstringens</i> .	43
3.7.1. Método de Soxhlet.	43
3.7.2. Maceración.	43

<b>3.7.3.</b> Cromatografía en columna y en capa fina preparativa.	<b>44</b>
<b>3.8.</b> Bioensayos para determinar la actividad inhibidora del crecimiento de <i>H. pylori</i> de muestras de referencia, extractos y fracciones.	<b>46</b>
<b>3.8.1.</b> Cálculo de la actividad mínima inhibitoria de los extractos acuosos por el método de dilución en agar (DA).	<b>46</b>
<b>3.8.2.</b> Cálculo de la actividad mínima inhibitoria de extractos y compuestos por el método de cultivo líquido (CL).	<b>48</b>
<b>3.8.3.</b> Cálculo de la actividad mínima bactericida de la mezcla de ácidos anacárdicos contra <i>H. pylori</i> .	<b>50</b>
<b>3.9.</b> Análisis de la actividad bacteriolítica de la mezcla de ácidos anacárdicos por microscopía electrónica de transmisión.	<b>50</b>
<b>3.10.</b> Análisis de toxicidad.	<b>51</b>
<b>3.10.1.</b> Citotoxicidad de la mezcla de ácidos anacárdicos determinado por el método de MTT en linfocitos humanos.	<b>51</b>
<b>3.10.2.</b> Análisis de toxicidad aguda de los extractos de <i>A. adstringens</i> por el método de Lorke.	<b>52</b>
<b>3.11.</b> Análisis de la presencia de compuestos activos de la corteza de <i>A. adstringens</i> en extractos acuosos	<b>52</b>
<b>3.12.</b> Relación estructura actividad de fenoles de cadena larga.	<b>53</b>
<b>3.12.1.</b> Separación de la mezcla de ácidos anacárdicos de referencia por cromatografía líquida de alta presión HPLC.	<b>54</b>
<b>3.13.</b> Desarrollo de un modelo animal de infección por <i>H. pylori</i> en <i>M. unguiculatus</i> .	<b>54</b>
<b>3.13.1.</b> Inoculación de los animales.	<b>54</b>
<b>3.13.2.</b> Grupos experimentales.	<b>55</b>
<b>3.14.</b> Prueba rápida en disco de papel (PRDP).	<b>56</b>
<b>3.14.1.</b> Aislamiento de microbiota del <i>M. unguiculatus</i> .	<b>58</b>
<b>3.14.2.</b> Determinación de actividad de ureasa, oxidasa y catalasa de los aislamientos con la PRDP.	<b>58</b>
<b>3.14.3.</b> Determinación del patrón de reacción de colonias ureasa y/o de oxidasa positiva en la PRDP.	<b>59</b>

3.14.4. Identificación de algunos microorganismos aislados del <i>M. unguiculatus</i> .	<b>59</b>
3.14.5. Determinación del número de <i>H. pylori</i> agregadas a muestras de estómagos de <i>M. unguiculatus</i> utilizando la PRDP.	<b>59</b>
3.14.6. Aplicación de la PRDP a muestras de agua corriente.	<b>60</b>
<b>4. Resultados y discusión.</b>	
4.1. Desarrollo de una metodología <i>in vitro</i> para determinar la actividad inhibidora del crecimiento de <i>H. pylori</i> de plantas.	<b>61</b>
4.2. Separación e identificación de compuestos inhibidores del crecimiento de <i>H. pylori</i> de la corteza de <i>A. adstringens</i> .	<b>63</b>
4.2.1. Método de Soxhlet.	<b>63</b>
4.2.2. Fraccionamiento en columna y CCFP.	<b>65</b>
4.3. Actividad inhibidora del crecimiento de <i>H. pylori</i> de compuestos de referencia de <i>A. adstringens</i> .	<b>69</b>
4.4. Actividad inhibidora del crecimiento de <i>H. pylori</i> de los ácidos anacárdicos y extractos mediante el método de DA.	<b>74</b>
4.5. Presencia de compuestos activos en extractos acuosos de la corteza de <i>A. adstringens</i> .	<b>76</b>
4.6. Actividad bactericida de la mezcla de ácidos anacárdicos.	<b>79</b>
4.7. Actividad bacteriolítica de la mezcla de ácidos anacárdicos.	<b>81</b>
4.8. Citotoxicidad de los ácidos anacárdicos y toxicidad aguda de extractos.	<b>84</b>
4.9. Relación estructura actividad de fenoles de cadena larga.	<b>86</b>
4.10. Separación de la mezcla de ácidos anacárdicos por cromatografía líquida de alta presión HPLC.	<b>89</b>
4.11. Desarrollo de un modelo animal de infección con <i>H. pylori</i> en <i>M. unguiculatus</i> .	<b>94</b>
4.12. Prueba Rápida en Disco de Papel (PRDP).	<b>103</b>
4.13. Microbiota y bacterias con actividad de ureasa aisladas del <i>M. unguiculatus</i> .	<b>106</b>
4.14. Capacidad de la PRDP para identificar colonias de <i>H. pylori</i> en cultivos complejos.	<b>112</b>
4.15. <i>Candida guilliermondii</i> en modelo de infección animal con <i>H. pylori</i> .	<b>117</b>



4.16. Sobre el posible mecanismo de acción de las plantas medicinales con actividad inhibidora del crecimiento de <i>H. pylori</i> .	121
<b>5. Conclusiones.</b>	<b>125</b>
<b>6. Bibliografía.</b>	<b>128</b>
<b>7. Glosario.</b>	<b>148</b>
<b>8. Publicaciones durante el periodo del doctorado.</b>	<b>149</b>

## ABREVIATURAS.

**AcOEt** Acetato de etilo.

**AINES** Antiinflamatorios no esteroideos.

**BB** Caldo Brucella Broth.

**BFC** Bioterio de la Facultad de Ciencias.

**BINN** Bioterio del Instituto Nacional de Nutrición.

**c**  $\beta$ -Ciclodextrinas.

**Ca** Agar Casman.

**CagA** Proteína asociada al gen A.

**Cag-Pai** Isla de patogenicidad

**CCF** Cromatografía en capa fina.

**CCFP** Cromatografía en capa fina preparativa.

**CG/EM** Cromatografía de gases / espectrometría de masas.

**CL** Método de cultivo líquido.

**CLSI** Clinical and Laboratory Standards Institute.

**CMB** Concentración mínima bactericida.

**CMHP** Consenso Mexicano sobre *H. pylori*.

**CMI** Concentración mínima inhibitoria.

**DA** Método de dilución en agar.

**DMSO** Dimetil sulfóxido.

**EGS** Enfermedades gástrico superiores.

**HPLC** Cromatografía líquida de alta presión.

**IBP** Inhibidores de bomba de protones.

**mAA** Mezcla de ácidos anacárdicos.

**mAL** Mezcla de aldehídos anacárdicos.

**MH** Medio Mueller Hinton.

**plus** Cóctel de antibióticos.

**PR** Patrón de reacción.

**PRDP** Prueba rápida en disco de papel.

**RMN<sup>13</sup>C** Resonancia magnética nuclear de carbono 13.

**RMN<sup>1</sup>H** Resonancia magnética nuclear protónica.

**s** Sangre de carnero desfibrinada.

**SSTIV** Sistema de secreción tipo IV.

**TMDP** Tetrametilfenilendiamina (reactivo de Kovacs).

**UFC** Unidades formadoras de colonias.

**VacA** Citotoxina vacuolizante.

## RESUMEN

En las últimas dos décadas se ha reconocido a la bacteria *Helicobacter pylori* como el principal agente causal de la gastritis crónica activa, la úlcera péptica y el cáncer gástrico. Por varios siglos en la medicina tradicional mexicana se han empleado diversas plantas que se sugiere alivian estos padecimientos. A pesar de que se han realizado estudios sobre sus efectos gastroprotectores de algunas de estas plantas, estos se ha hecho considerando factores etiológicos distintos al de la bacteria, como son el exceso de acidez, el estrés, la ingesta de alcohol, irritantes y algunos medicamentos. En este trabajo se dan a conocer los resultados de la actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori* por parte de la corteza de *Amphipterygium adstringens*, la cual es ampliamente utilizada en nuestra medicina tradicional para tratar la gastritis y las úlceras. Se desarrolló una metodología *in vitro* para determinar la magnitud de dicho efecto y con la cual se catalogó a la corteza con una actividad moderada. Para separar e identificar los compuestos activos se realizó una extracción continua con diferentes solventes, encontrándose con el mayor efecto al de éter de petróleo, el cual presentó una CMI de 160 µg/ml. De este extracto se identificó y separó por métodos cromatográficos una mezcla de ácidos anacárdicos como el principal compuesto activo (CMI 12.5-25 µg/ml y CMB 16 µg/ml). Así también, mediante compuestos previamente aislados de la corteza, se encontraron activos el ácido 3-epioleanólico (CMI 200 µg/ml) y una mezcla de aldehídos anacárdicos (CMI 6.25 µg/ml). A pesar de estos resultados, ninguno de los compuestos antes mencionados se identificó en un extracto acuoso, el cual fue activo contra diversas cepas de *H. pylori* (CMI 500 a <125 µg/ml), lo que indica la existencia de otros metabolitos con actividad que no fueron identificados en este estudio.

Para estudiar la relación de la estructura química de los fenoles de cadena larga con la actividad inhibidora sobre la bacteria, se analizó el efecto de varios anillos con diversos sustituyentes, de cadenas con distinto grado de insaturación y tamaño, así como de algunos compuestos estructuralmente relacionados. Los únicos que mostraron actividad fueron las cadenas así como el ácido cinámico. Para el caso de los ácidos anacárdicos presentes en la mezcla se separaron por medio de HPLC, sin embargo presentaron impurezas y no fue posible caracterizar la estructura química exacta.

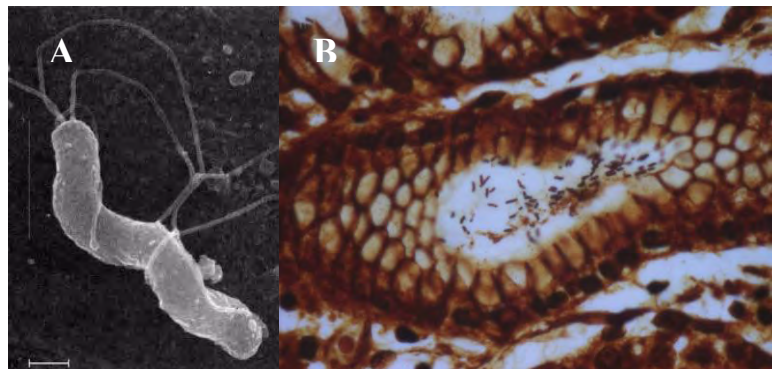
En este estudio no se logró analizar la actividad de los extractos y compuestos en un modelo animal, lo cual hubiera dado mayor peso a los resultados encontrados en los estudios *in vitro*. Por otra parte se pudo desarrollar e iniciar el trámite de patente de una prueba que permite identificar colonias de *H. pylori* en cultivos complejos y que denominamos Prueba Rápida en Disco de Papel.

## 1. INTRODUCCIÓN.

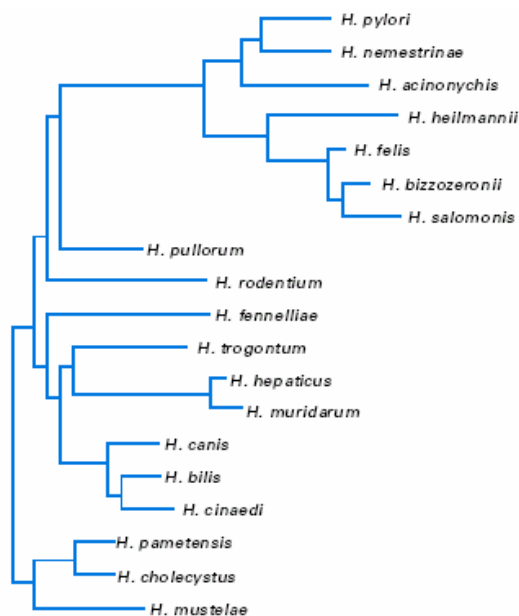
### 1.2. *Helicobacter pylori*.

En 1893 Bizzozero informó por primera vez sobre la presencia de microorganismos espirales en biopsias de estómagos de mamíferos. Posteriormente en 1899 se relacionó su presencia con desordenes del tracto gastrointestinal inferior, sin embargo se creía que su papel no era estrictamente el de un patógeno<sup>199</sup> (figura 1). No fue hasta 1983 cuando los investigadores australianos Barry Marshall y Robin Warren pudieron aislar al microorganismo y para demostrar su carácter patológico realizaron experimentos de auto ingestión de cultivos, con los que encontraron que se cumplían los postulados de Koch, así como también que el daño producido por el microorganismo se revertía al eliminarlo con el uso de antibióticos<sup>119,121,122</sup>.

En 1987 la bacteria se incluyó dentro del género *Campylobacter* debido a que compartía con este grupo algunas características, como es su morfología curvada, el crecimiento en medios ricos y condiciones microaerofílicas, su incapacidad para fermentar glucosa, la sensibilidad a metronidazol y el contenido de G-C en su ADN (34 %)<sup>118</sup>. Posteriormente, estudios de microscopía electrónica mostraron que tenía múltiples flagelos unipolares (en contraste con los bipolares de *Campylobacter*), así como los estudios bioquímicos indicaron diferencias en el tipo de proteínas y ácidos grasos, además el análisis de la secuencia del ARNr 16s mostró una distancia suficiente para excluir a la bacteria de este género y crear uno nuevo, el cual fue denominado *Helicobacter* y cuyo primer miembro fue *H. pylori*<sup>54,117</sup>. Actualmente, este género cuenta con 18 especies validadas por el Comité Internacional de Sistemática Bacteriológica<sup>63</sup> (figura 2). En 2005 Marshall y Warren recibieron el premio Nobel de Fisiología o Medicina por el descubrimiento de la bacteria *H. pylori* y su papel en la gastritis y la úlcera péptica.



**Figura 1.** A. Micrografía electrónica de *H. pylori*, en la que se aprecian los flagelos unipolares y la morfología en espiral típica de la bacteria. B. Corte histológico teñido con Warthin-Starry de un estómago humano colonizado con la bacteria.



Especies de <i>Helicobacter</i>	Hospedero natural	Enfermedades que causan
<i>pylori</i>	Humano, algunos primates	Gastritis/úlcera péptica y cáncer
<i>acinonychis</i>	Chita	Gastritis
<i>felix</i>	Perro y gato	Gastritis
<i>heilmannii</i>	Puerco, gato, perro y chango.	Gastritis/úlcera
<i>mustelae</i>	Hurón	Gastritis/úlcera
<i>pullorum</i>	Gallina	Hepatitis
<i>canis</i>	Perro y gato	Gastroenteritis, hepatitis
<i>bilis</i>	Ratón y rata	Hepatitis
<i>hepaticus</i>	Ratón	Hepatitis, hepatocarcinoma
<i>rappini</i>	Oveja	Aborto, necrosis hepática
<i>fennelliae</i>	Humano	Proctitis, colitis
<i>cinaedi</i>	Humano y Hamster	Proctitis, colitis

**Figura 2.** El dendrograma muestra la clasificación de algunas especies del género *Helicobacter* basada en la secuencia del ARNr 16s<sup>117</sup> y en la tabla sus principales especies patógenas<sup>59</sup>.

### 1.3. Patogenicidad.

En la últimas dos décadas se ha reconocido a *H. pylori* como el principal agente causal de la gastritis crónica activa y se ha indicado que es la responsable del 85 % de los casos de úlceras

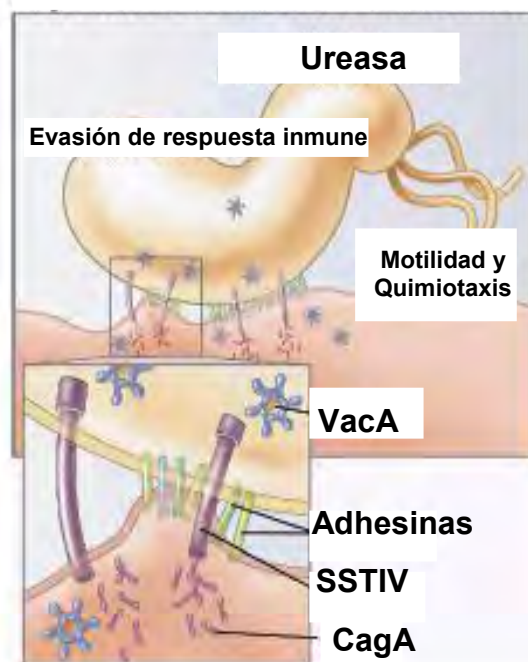
gástricas y del 95 % de las duodenales, además de que la Organización Mundial de la Salud la ha declarado como un carcinógeno tipo 1(definitivo)<sup>97,98</sup>.

Se han descrito diversos factores de virulencia involucrados en la colonización gástrica, daño al tejido y sobrevivencia<sup>98,199</sup> (figura 3). De los principales factores de colonización se encuentran el flagelo que le permite tener movimiento en la capa de moco, la enzima ureasa de vital importancia para la neutralización del ácido gástrico y las adhesinas que le permiten anclarse al epitelio gástrico<sup>56,164</sup>. Sobre los factores de la bacteria involucrados en la inflamación y daño al tejido gástrico podemos mencionar a la citotoxina vacuolizante (VacA), la cual es una proteína inmunogénica secretada por alrededor del 50 % de las cepas y que provoca la formación de grandes vacuolas en el citoplasma de las células epiteliales. Se ha encontrado que VacA produce un aumento en la permeabilidad favoreciendo la salida de nutrientes y que induce la formación de canales a través de la bicapa lipídica<sup>98,148,205</sup>. Todos los factores mencionados son importantes en el daño, pero se plantea que el determinante en la patogenicidad está dado por un conjunto de genes que constituyen una isla de patogenicidad (Cag-Pai) que codifica para un sistema de secreción tipo IV<sup>98</sup>. Se sabe que el 60 % de las cepas de *H. pylori* producen proteínas codificadas por esta isla, como es CagA (proteína asociada al gen A), así como otras involucradas en la formación del sistema de secreción y la inducción de IL-8<sup>98</sup>. La proteína CagA es fosforilada por cinasas y se une a varias proteínas blanco que afectan a su vez las uniones intercelulares y una serie de señales diversas en la célula hospedera<sup>148</sup>. Dentro de los factores de sobrevivencia, la bacteria posee una superóxido dismutasa y una catalasa que le ayudan a prevenir la fagocitosis<sup>177</sup>.

#### **1.4. Métodos de diagnóstico.**

Los métodos invasivos requieren la toma de una biopsia del paciente por medio de endoscopia. Una vez obtenida la biopsia, el principal método de diagnóstico es el cultivo en medios ricos

suplementados con sangre, en los que al cabo de un tiempo de incubación de 5 a 10 días se identifican las colonias de *H. pylori* por medio de tres pruebas bioquímicas básicas (ureasa, oxidasa y catalasa), así como por tinción de Gram<sup>129,132</sup>. El tejido también se emplea para realizar un estudio histopatológico, en el cual se utilizan tinciones para diferenciar la bacteria del tejido como son las argénticas o inmunohistoquímica<sup>129</sup>. La prueba rápida urea-ureasa es otro método que por su rapidez y sencillez es ampliamente utilizado y consiste en incorporar parte de la biopsia en una solución con urea y rojo de fenol, considerando un resultado positivo cuando hay un viraje a rosa<sup>101,127</sup>. Un método molecular que es empleado para analizar la biopsia es el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (siglas en inglés PCR) con el que también se ha podido realizar el diagnóstico a partir del jugo gástrico<sup>129</sup>.



**Figura 3.** Principales factores de virulencia y colonización de *H. pylori*. SSTIV: sistema de secreción tipo IV. VacA: citotoxina vacuolizante. CagA: proteína asociada al gen A<sup>5</sup>.

En cuanto a los métodos no invasivos se encuentra la prueba de rompimiento de urea (PRU), en la cual se administra al paciente urea marcada radiactivamente [ $^{14}\text{C}$ ] que es hidrolizada en el estómago por la enzima ureasa de *H. pylori* liberando  $\text{CO}_2$  marcado, el cual es posteriormente detectado en la exhalación<sup>120</sup>. También, existen métodos basados en la detección de anticuerpos principalmente en sangre, e identificación de IgG en orina y saliva<sup>129</sup>. Se ha ensayado el diagnóstico de *H. pylori* en muestras de heces por medio de PCR, así como por antígenos, no obstante aún no se encuentran completamente implementados y presentan problemas de especificidad<sup>129</sup>.

Numerosos estudios sobre especificidad y sensibilidad a estas pruebas han sido realizados para determinar su precisión. En un estudio hecho por Thijs y colaboradores en 1996, en el que evaluaron varias pruebas de diagnóstico para *H. pylori* en 105 pacientes, registraron la PRU, el cultivo y el PCR como las más precisas, con el 96 al 100 % de sensibilidad y con el 100 % de especificidad<sup>188</sup>. Aunque en la práctica clínica, la combinación de varias de ellas permite dar un diagnóstico mucho más preciso. De acuerdo al Consenso Mexicano sobre *H. pylori* (CMHP) se requiere de un estudio endoscópico si el cuadro clínico indica úlcera péptica o linfoma tipo MALT y debe de realizarse una prueba rápida de urea-ureasa. El estudio histológico estara indicado si la prueba inicial es negativa y el índice de sospecha de tener estas enfermedades es elevado. En aquellos casos con una historia documentada de úlcera péptica, enfermos en tratamiento con antiinflamatorios no esteroideos (AINES) o inhibidores de bomba de protones (IBP), anemia por deficiencia de hierro, púrpura trombocitopénica idiopática o por deseo expreso de la persona, se debe de utilizar la PRU<sup>1</sup>.

### **1.5. Esquemas de erradicación.**

A nivel mundial para erradicar a la bacteria se utiliza principalmente la denominada terapia triple, la cual consiste en administrar de 10 a 14 días la combinación de dos antibióticos (amoxicilina, claritromicina, tetraciclina, metronidazol entre otros de menor uso) y un inhibidor de la secreción de



ácido<sup>53,71</sup>. Este tratamiento se reporta que no es efectivo en alrededor del 10 al 20 % de los casos debido a la aparición de cepas resistentes, por lo que en esta situación se utilizan las terapias cuádruples, en la que se maneja además bismuto y la combinación de otros antibióticos diferentes a los previamente utilizados<sup>55, 60, 65,160,182</sup>. La elección de los antibióticos a usar inicialmente en la terapia triple viene determinada por la prevalencia local en las resistencias antimicrobianas, las cuáles no sólo varían entre países sino también entre distintas zonas geográficas. Si no se logra eliminar a la bacteria con los antibióticos utilizados en la terapia triple, se debe de instaurar como *tratamiento de rescate* la terapia cuádruple, si esta segunda terapia de erradicación falla, la recomendación habitual por múltiples reuniones de consenso sobre el tema, es realizar un cultivo y antibiograma a fin de pautar un tercero e incluso cuarto *tratamiento de rescate* para lograr tasas de erradicación próximas al 100 %<sup>55,182</sup>.

Existen otros esquemas como los secuenciales y los denominados a corto plazo (menores a 7 días) en los que se dan dosis más altas o se dan combinaciones diferentes de antibióticos, IBP y sales de bismuto, pero que en definitiva emplean los mismos medicamentos y tampoco se logra obtener una tasa de erradicación del 100 % en todos los casos<sup>1,2,65</sup>.

Todos estos esquemas comparten entre sí una elevada administración de medicamentos, lo que a su vez conlleva a efectos adversos (diarrea, alteraciones del gusto, náusea y/o vómito, dolor epigástrico, cefalea, estomatitis y erupciones cutáneas) aunque estos solo se presentan entre el 20 y 50 % de los pacientes, además de que son considerados como leves o transitorios y han obligado a la suspensión del tratamiento a no más del 10 %<sup>1</sup>.

Para México el CMHP indica la erradicación de la bacteria únicamente en los casos en el que se presente: 1.-úlceras pépticas activas con o sin complicaciones, 2.- gastritis atrófica y metaplasia intestinal, 3.- linfoma gástrico tipo B en la zona marginal (tipo MALT), 4.- después de una resección gástrica parcial por cáncer, 5.- familiares cercanos a personas que han tenido cáncer gástrico y tienen *H. pylori*, 6.- pacientes con uso crónico de inhibidores de bomba de protones (IBP) ó antiinflamatorios

no esteroideos (AINE), 7.- pacientes con púrpura trombocitopénica idiopática y anemia por deficiencia de hierro de causa no explicada<sup>1</sup>.

### **1.6. Modo de acción y resistencia a antibióticos.**

La idea inicial de lograr eliminar la infección con el uso de un único antibiótico ha ido desapareciendo y hay suficiente evidencia de que se requiere la combinación de drogas para poder erradicarla del estómago<sup>65,100,170</sup>.

La claritromicina (macrólido) y el metronidazol (nitromidazol) (figura 4), son los antibióticos más usados para el tratamiento contra *H. pylori*, aunque el último ya ha ido en desuso debido a la elevada resistencia que la bacteria ha desarrollado<sup>100,170</sup>. La forma como actúa la claritromicina, es inhibiendo la síntesis de proteínas, al unirse directamente a la subunidad mayor del ribosoma 23S del ARNr<sup>147</sup>. Se reporta que a nivel mundial la resistencia a claritromicina ha aumentado en los últimos cinco años en un 10 % y en algunas regiones ha alcanzado el 50 %<sup>65,127</sup>. Se plantea que la resistencia es debida a mutaciones puntuales en el gen 23S ARNr (específicamente en la región de la actividad peptidil-transferasa en el dominio V), que provoca una disminución en la capacidad de unión del antibiótico al ribosoma<sup>147,200,201</sup>.

Para el caso del metronidazol (figura 4) la resistencia al antibiótico varía entre 10 y 50 % pero en algunas regiones puede alcanzar hasta un 95 %<sup>42,65,72</sup>. El metronidazol se activa reduciendo su grupo nitro al llegar a la célula blanco, dando como resultado la generación de un radical libre el cual oxida el ADN bacteriano provocando la ruptura de la doble hélice<sup>174</sup>. Se han encontrado varias enzimas en *H. pylori* involucradas en la activación del metronidazol como la piruvato-flavodoxina oxidoreductasa y la nitrorreductasa insensible a oxígeno<sup>70</sup>. Mutaciones en el gen *rdrA* que codifica para la nitrorreductasa, producen proteínas inactivas y conducen por tanto a la resistencia, sin

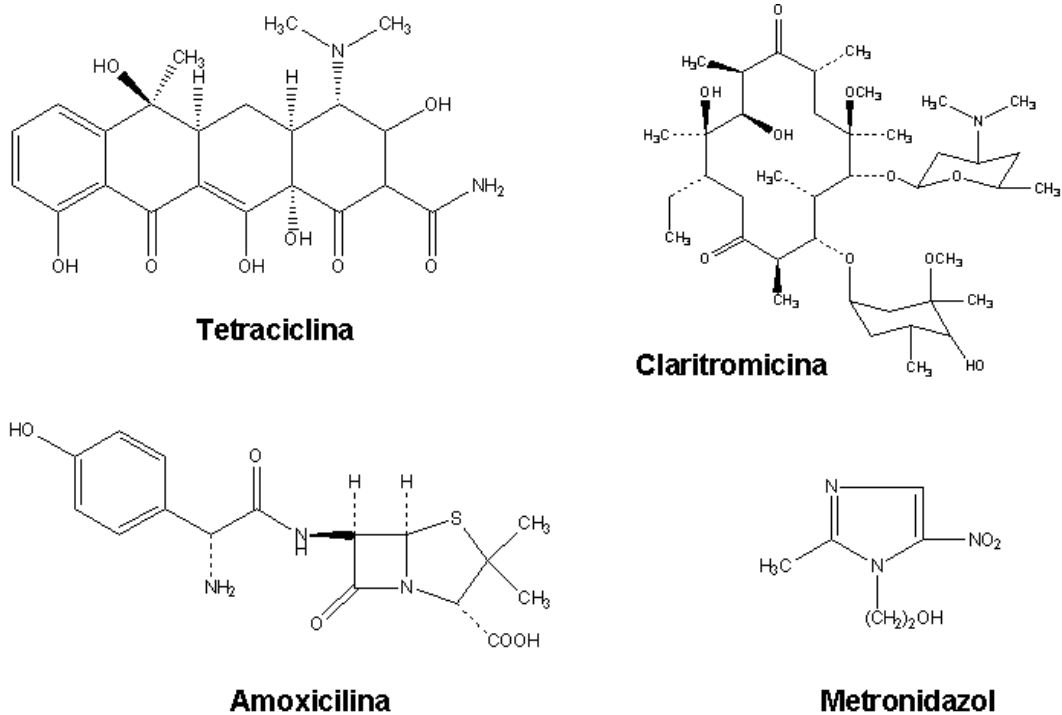
embargo, se piensa que este no es el único mecanismo involucrado ya que existen cepas resistentes al metronidazol que no presentan mutaciones en este gen<sup>50, 85</sup>.

La amoxicilina (penicilina) (figura 4) se une a las proteínas llamadas de pegado a penicilinas (PBP) y de esta manera interfiere con la síntesis de la pared celular produciendo lisis en la bacterias que se están replicando<sup>29,65</sup>. Es el antibiótico al que menos resistencia se ha encontrado 0 al 1.3 %, aunque Gerrits y colaboradores en 2006 reportan que pueden llegar hasta el 30 %<sup>65,127</sup>. Se sabe que las bacterias Gram-negativas frecuentemente se hacen resistentes a los  $\beta$ -lactámicos por la producción de la  $\beta$  lactamasa (rompe el anillo beta-lactámico de las penicilinas) sin embargo, no se ha reportado ninguna cepa de *H. pylori* que produzca esta enzima<sup>151, 175</sup>. Otros mecanismos propuestos para la resistencia a  $\beta$ -lactámicos son mutaciones en las proteínas de unión a penicilinas (PBPs), decremento en la permeabilidad de la droga a través de la pared celular y alteraciones en las bombas y porinas<sup>65</sup>. Las PBP's son un grupo de enzimas involucradas en la biosíntesis del peptidoglicano de la pared celular y para el caso de *H. pylori* se ha demostrado que algunos cambios en PBP1 generan resistencia a amoxicilina<sup>151</sup>.

En cuanto a la tetraciclina (figura 4), la actividad es debida a su unión a la subunidad 30s ribosomal, lo cual bloquea la fijación del aminoacil ARNt al sitio del complejo ARN mensajero-ribosoma<sup>195</sup>. La resistencia a este antibiótico se puede considerar baja y es menos del 2 %, aunque la tasa más elevada reportada es del 10 %<sup>65,99</sup>. El mecanismo de resistencia a tetraciclina aún no se ha determinado, sin embargo se ha visto que mutaciones en el ARNr 16S impiden la unión del antibiótico al ribosoma<sup>195</sup>.

Existen otros antibióticos contra *H. pylori* como es el caso de las fluoroquinolonas, aunque son poco utilizadas por su bajo efecto en la erradicación de la bacteria ya que son inactivadas por el jugo gástrico<sup>29</sup>. Se han encontrado cepas resistentes a este antibiótico, aunque la tasa se puede considerar baja ya que va de 4.75 % a 11 %<sup>28,50</sup>. La actividad antibiótica de las fluoroquinolonas radica en que

inhiben la subunidad A de la ADN girasa y la resistencia está asociada a mutaciones en el gen *gyrA*, que codifica para las subunidades A de la enzima<sup>133</sup>.



**Figura 4.** Estructura química de los principales antibióticos utilizados en las terapias de erradicación de *H. pylori*.

### 1.7. *H. pylori* en México.

Se estima que la bacteria se encuentra presente en la mitad de la población mundial y la prevalencia varía dependiendo de factores socioeconómicos que inciden directamente en las condiciones sanitarias de las comunidades<sup>190</sup>. Sin embargo, solo del 10 al 20 % puede desarrollar úlcera péptica y del 1 al 3 % cáncer gástrico<sup>98,117,192</sup>. En países desarrollados del 2 al 50 % de las personas se encuentran infectadas, mientras que en los países en vías de desarrollo o subdesarrollados puede exceder al 80 %, siendo las tasas en países africanos las más altas registradas, las cuales pueden ser mayores al 95 % en adultos de más de 21 años<sup>61</sup>. La disminución en países desarrollados está

asociada al mejoramiento en las condiciones higiénicas, así como al uso de antimicrobianos en las últimas décadas<sup>65</sup>.

En México un estudio serológico con 11,605 sueros de personas entre 1-90 años de todas las regiones del país, mostró una seroprevalencia global del 66 %, así también, se encontró que se adquiere a edades tempranas alcanzando un 80 % en adultos jóvenes entre 30 y 40 años de edad, con una tasa de incremento del 5 % anual durante los primeros 10 años de vida<sup>191</sup>. Se relaciona la frecuencia de la bacteria con el 85 al 90 % de las úlceras pépticas y más del 90 % con el cáncer gástrico y se señala al adenocarcinoma gástrico como la neoplasia más frecuente del aparato digestivo con tasas de letalidad muy altas en algunos estados de la república<sup>192</sup>.

### **1.8. Hacia un mejor entendimiento de la bacteria *H. pylori*.**

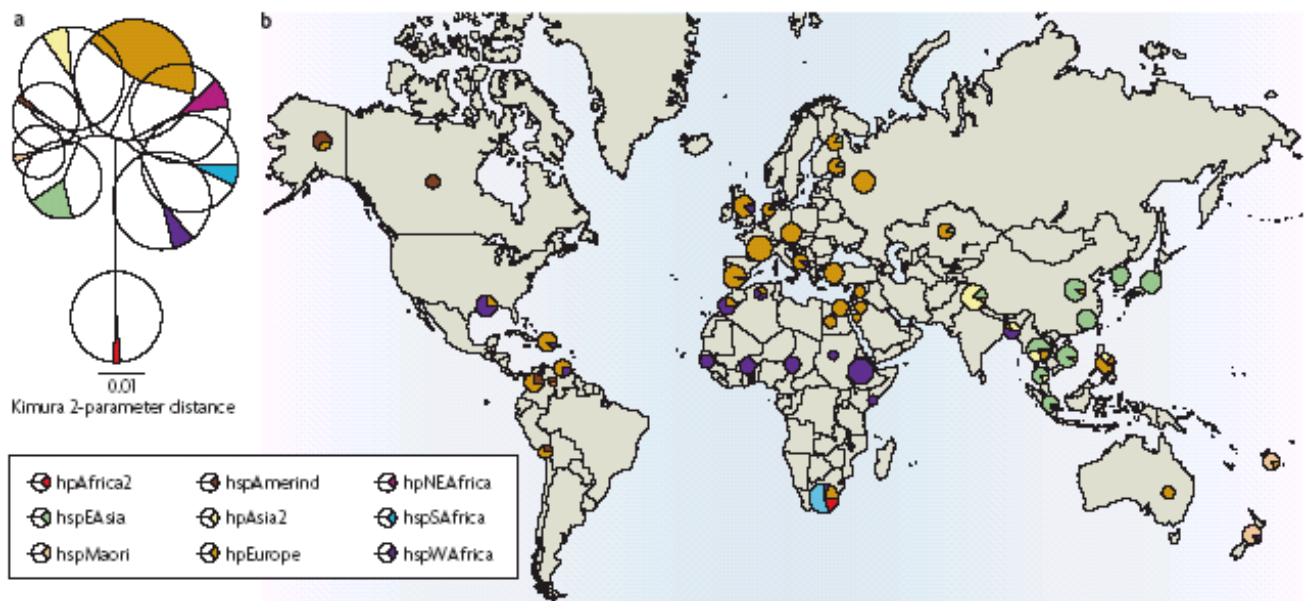
El haber demostrado que la bacteria *H. pylori* es un agente infeccioso causante de úlcera péptica y cáncer gástrico, ha sido el descubrimiento más importante en los últimos cincuenta años dentro del campo de la gastroenterología<sup>65,118</sup>. Sin embargo Torres en 2000 señala que desde el punto de vista de las compañías farmacéuticas ha sido considerado como un patógeno estricto, por lo cual se ha buscado la forma de erradicarlo, esto a pesar de que la mayoría de las personas colonizadas no desarrollan las patologías<sup>190</sup>.

En los últimos años se ha empezado a documentar un posible efecto benéfico por parte de la bacteria, ya que se ha encontrado que existe un alto riesgo de desarrollar enfermedades emergentes denominadas gástrico superiores (EGS) (reflujo gastroesofágico, síndrome de Barret y cáncer de esófago) en pacientes en los que se ha erradicado, así como un aumento drástico en la incidencia de las mismas dentro de la población humana, a medida que *H. pylori* ha ido desapareciendo<sup>17,18,19, 22</sup>. Bajo este panorama, se ha recomendado usar la terapia de erradicación únicamente en pacientes con gastritis crónica atrófica, úlcera péptica y cáncer gástrico, en los que el beneficio es alto y se ha

señalado que antes de empezar con una campaña de erradicación mundial de la bacteria, debemos de entender mucho mejor su papel con el humano<sup>190</sup>.

Actualmente, se ha demostrado que la bacteria no es de reciente aparición y que ha estado con nosotros durante miles de años, incluso se ha propuesto su uso como un marcador de migración humana<sup>58,109,179</sup>. Las diferencias entre las secuencias de siete genes denominados caseros (housekeeping) así como Vac A, se utilizaron para dividir a las poblaciones de *H. pylori* en seis principales, cada una de ellas con distinta distribución geográfica, cuatro son relativamente homogéneas (hpEuropa, hpAsia2, hpAfrica2 y hpNEAfrica) y dos son compuestas de subpoblaciones (hpAfrica1 (hspWAfrica y hspSAfrica) y hpEsteAsia (hspEAsia, hspMaori y hspAmerindios) (figura 5).

Todas las cepas modernas pueden trazarse a partir de cinco poblaciones antiguas, dos de África, dos de Eurasia central y occidental, así como una al este de Asia<sup>58,109</sup>. Este descubrimiento tiene gran importancia, ya que reflejan migración humana y pueden ayudar a resolver muchas interrogantes de gran valor antropológico. Como ejemplo de esto, se puede observar que las cepas que presentan nativos americanos en Venezuela contienen una amplia proporción de nucleótidos ancestrales asiáticos, lo que es consistente con la migración de las poblaciones por el estrecho de Bering hace aproximadamente 12,000 años<sup>109</sup>. También, se ha podido demostrar el origen africano tanto del humano como de *H. pylori*, el cual se calculó es de 58,000 años (además se estima que coexistieron 1000 años antes del inicio de las migraciones) donde posteriormente en un proceso coevolutivo se dispersaron por el resto del mundo<sup>109</sup>. Aún más, se plantea que *H. pylori* ha estado presente con nosotros desde que el humano se puede denominar humano (alrededor de 200,000 años) y que incluso la asociación de las diferentes especies de *Helicobacter* que colonizan los estómagos de animales actuales, pudo darse a la par que se presentaba la radiación de los mamíferos<sup>20</sup>.



**Figura 5.** Poblaciones de *H. pylori* y su distribución mundial. a: *H. pylori* dentro de seis poblaciones principales. Árbol filogenético de las poblaciones y subpoblaciones; los diámetros de los círculos representan la diversidad genética dentro de la población y los ángulos son proporcional al número de aislamientos. b: distribución de las nueve poblaciones y subpoblaciones hecha con 76 cepas estudiadas. Los círculos colocados en 51 diferentes localidades, representan la abundancia relativa de una población en una localidad dada<sup>179</sup>.

Se sabe que *H. pylori* es la única bacteria capaz de habitar en el estómago, el cual es su único nicho y al cual está plenamente adaptada. Cabe señalar que con el empleo de técnicas moleculares se ha identificado en otras fuentes como son el agua y alimentos, pero hasta el momento únicamente se ha podido aislar de muestras de estómagos<sup>73</sup>. El principal modo de transmisión propuesto es de madre a hijo o familiares cercanos, el cual se da en los primeros años de vida<sup>20</sup>. Una característica importante de la población bacteriana es su elevado polimorfismo, además de que en un mismo hospedero pueden coexistir diversas cepas<sup>24</sup>. La diversidad alélica dentro de las mismas es creada por recombinación y la estructura poblacional se define como cuasi-panmítica, la cual presenta altas tasas de recombinación, transformación natural, conjugación o transferencia de fagos<sup>179</sup>. Se propone que existe una tensión que genera un conjunto de variantes genéticas con suficiente diversidad para ocupar diferentes nichos potenciales dentro del estómago, por lo que se puede decir que no todas las *Helicobacter* dentro de un hospedero son “creadas” iguales<sup>18,19,21,24,87</sup>.

Por otra parte, hay evidencia de que la bacteria es capaz de regular diferentes funciones fisiológicas del estómago humano, una de ellas es por medio de la gastrina, la cual es importante para controlar la acidez estomacal<sup>23,24</sup>. Se asocia fuertemente la presencia de cepas CagA positivas con la capacidad de mantener un ambiente de acidez bajo, ya que su eliminación se relaciona con el aumento de la misma y el posterior desarrollo del reflujo gastroesofágico<sup>24</sup>. También, se plantea que es capaz de regular la leptina (inhibe el apetito) y la grelina (estimula el apetito), debido a que su erradicación estimula la producción de la segunda, favoreciendo la obesidad y a su vez el desarrollo de diabetes tipo 2<sup>24</sup>. Así también, la bacteria ha desarrollado diversos mecanismos de persistencia y evasión de respuesta inmune, uno de ellos es la relación que se ha encontrado entre VacA y su regulación negativa en la producción de linfocitos T reguladores, así como su antagonista CagA, que estimula la producción de los mismos<sup>24</sup>. Del mismo modo CagA es capaz de estimular la liberación de prostaglandinas, las cuales están involucradas directamente en la producción de moco y bicarbonato por parte de las células del hospedero<sup>199</sup>.

Algo muy importante que hay que mencionar, es que la bacteria comparte características que presentan bacterias que se catalogan de la microbiota natural como son: a) habita en un ambiente como el estómago, el cual contiene múltiples micronichos con características estructurales y fisicoquímicas determinadas; b) la adquisición de la bacteria se da en etapas tempranas; c) diversas cepas colonizan el estómago; d) se mantienen estables durante décadas y e) pueden presentar posibles interacciones de competencia y cooperación<sup>20,24</sup>.

Por otra parte, un punto a resolver y que ayudará a esclarecer muchas interrogantes, es la estimación de la diversidad total de posibles especies de *Helicobacter* y la de otros microorganismos presentes en los estómagos humanos. Sin embargo la característica de la población cuasi-panmítica, el elevado polimorfismo, así como la gran diversidad de *H. pylori* presentes en un mismo estómago, aunado a diferencias en los criterios taxonómicos, crean problemas para lograr este cometido. En un estudio realizado por Hannula y Hanninen en 2007 se señala que el uso de marcadores basados en la



secuencia del gen del ARNr 16s para *Helicobacter*, no sirven para poder resolver a nivel de especie y plantean el uso de un marcador basado en la subunidad B de la girasa (permite separar los dos grandes grupos de *Helicobacters*, las gástricas y las hepáticas), así como la necesidad de usar otros marcadores para poder lograr una buena resolución<sup>75</sup>. En un trabajo hecho por Matsumoto y colaboradores en 2009 lograron identificar una cepa presente en el estómago de un paciente japonés, la cual por medio de la secuencia del gen del ARNr 16s es ubicada como candidato a *Helicobacter helmanii* (relacionada con estómagos de chitas). Cuando se usan como marcadores los fragmentos de los genes *ureA* y *ureB*, se encuentra que corresponde a una especie no descrita que habita el estómago humano, la cual es capaz de colonizar ratones axénicos e inducir inflamación en la mucosa gástrica, además de que no es cultivable<sup>126</sup>. Así también, usando librerías de clonas del gen del ARNr 16s de muestras de 23 pacientes, se reporta que la diversidad registrada es mucho mayor de la que se estima en estudios previos, aunque *H. pylori* sigue siendo la especie dominante con el 70 % de las clonas<sup>15</sup>. Un dato interesante del estudio lo presentó un grupo de seis individuos, en los cuales no se detectó a *H. pylori* por métodos clínicos convencionales, pero sí por medio de las librerías, indicando que las pruebas clínicas tienen una sensibilidad menor al no detectar un bajo número o variedad de *H. pylori*<sup>15</sup>.

Los distintos criterios taxonómicos, aunado a que solo una porción de toda la diversidad microbiana presente en el estómago es cultivable, nos plantean la idea de que los resultados encontrados hasta el momento podrían ser únicamente el reflejo de la porción cultivable de las “*Helicobacters*” totales dentro de los estómagos, así como también, que aún falta conocer muchos elementos para poder entender realmente el papel que juega esta bacteria con el humano.

### **1.9. *H. pylori* ¿patógeno o biota natural del humano?**

Conforme a la literatura actual, para explicar la interrogante *H. pylori* ¿patógeno o biota natural del humano? se pueden delimitar básicamente dos hipótesis:

Hipótesis A, es patógena siempre y el grado de daño se da por la combinación de varios factores. Considera a *H. pylori* como un patógeno estricto que infecta la mucosa gástrica humana en una proporción alta de la población, sin embargo, la infección produce en la mayoría una gastritis superficial asintomática la cual puede degenerar en gastritis crónica (sintomática), úlcera péptica, linfomas y cáncer gástrico. El desarrollo de la enfermedad (o grado de daño) en cada individuo, es el resultado de una compleja interrelación entre factores del hospedero, bacterianos y ambientales<sup>4,117,199</sup>.

Hipótesis B, es un simbiote y la patogenicidad se debe a un desequilibrio en la microecología gástrica que se está dando en la era moderna. En esta hipótesis, la bacteria se considera principalmente como un simbiote que ha estado en asociación con el humano por miles de años y es en las últimas décadas que ha empezado a adoptar un comportamiento patógeno. El desarrollo de las patologías crónicas, como la gastritis crónica activa, la úlcera péptica y el cáncer gástrico, son el resultado del rompimiento de una serie de equilibrios tipo Nash, o sistemas evolutivos estables, que se dan en varios niveles jerarquizados como son<sup>24</sup>: 1.- El microscópico, el cual se presenta por la generación de inmunidad del hospedero (células del sistema inmune) y su neutralización para la persistencia por parte de la bacteria. Las interacciones resultantes de estas dos poblaciones a lo largo de miles de años pueden presentarse como persistencia bacteriana activa, en el que necesariamente requiere de una red de señales y controles fisiológicos regulados; 2.- el mesoscópico, el cual es el resultado de las interacciones a nivel microscópico y se presenta como las características anatomofisiológicas del tejido o nicho; 3.- el macroscópico, que es la suma de estos dos niveles que se expresan como la estructura de la población hospedera. Una manera de entender esta idea, es considerar que la persistencia bacteriana desarrolla junto con el sistema inmune una serie de estrategias evolutivas estables, las cuales operan simultáneamente en las múltiples escalas (microescala, mesoescala y macroescala), para dar como resultado una homeostasis general que puede ser denominada holobionte, el cual asemeja a lo que en ecología es denominado comunidad clímax<sup>9,17,18,19,20,21,24</sup>. Las principales ideas entre estas dos hipótesis se resumen en la tabla 1.

**Tabla 1.** Ideas y fundamentos de las dos hipótesis sobre la simbiosis o patogenicidad de *H. pylori*.

Hipótesis A:	Hipótesis B:
1.-Es patógena. En cuanto a un simbiote argumentan no hay suficiente evidencia.	1.-No hay una distinción fija entre simbiote o patógena, el comportamiento biológico es definido por el contexto ecológico.
2.-Siempre hay daño, pero la intensidad depende de una combinación de factores. No considera el tiempo de aparición de las enfermedades.	2.-No siempre hay daño. Considera la idea de enfermedades emergentes.
3.-Sistema inmune intenta erradicarla.	3.-Persistencia bacteriana: requiere coexistencia gobernada por un equilibrio (intercambio de señales para mantener una coevolución entre sistema inmune y microorganismo).
4.-Hay que eliminarla (desarrollo de vacunas y terapias con antibióticos).	4.-No hay que eliminarla indiscriminadamente.
5.-La diversidad de poblaciones de <i>H. pylori</i> dificulta predecir el desarrollo de la enfermedad.	5.-La diversidad de poblaciones de <i>H. pylori</i> en equilibrio evitan el desarrollo de enfermedades crónicas.
6.-La edad de adquisición a edad temprana (niñez) está relacionada con el estado socioeconómico bajo, lo que aumenta el riesgo de úlcera gástrica y cáncer gástrico (estos dos últimos puntos no explican el enigma Africano*).	6.-Adquisición en edades tempranas por madre/familiares (transmisión vertical) favorece persistencia y por tanto relación simbiótica (estos dos últimos puntos podrían explicar el enigma Africano).

\*El enigma Africano, es una “discrepancia” o “paradoja” de la presencia de un alto número de personas colonizadas en África con cepas consideradas altamente virulentas y la baja incidencia de enfermedades como el cáncer gástrico.

### 1.10. ¿Qué determina que *H. pylori* cause enfermedad?

Ambas hipótesis parecen coincidir que en el desarrollo de las patologías actúan factores externos. Para el caso de A, la intensidad del daño va a depender de la combinación de factores como son los del hospedero (edad de adquisición, secreción de ácido, el tipo de respuesta inmune), del estilo de vida (estado socioeconómico, proximidad con animales, calidad del agua, higiene, la dieta (específicamente una concentración alta de sal), fumar, alcoholismo, la disminución en el consumo de frutos y vegetales que contienen antioxidantes como vitamina C y  $\beta$ -caroteno), así como la presencia de cepas bacterianas catalogadas como altamente virulentas<sup>4,117,199</sup>.

Para el caso de B, el desequilibrio de las poblaciones dentro del estómago fue causado básicamente por el uso desmedido de antibióticos en la era moderna (siglo XX), así como de factores que influyeron directamente en la tasa de transmisión vertical (mejoramiento higiénico, cambios conductuales y sociales), la cual es fundamental en bacterias pertenecientes a la microbiota natural del humano<sup>9,17,18,19,20,21,24</sup>.

Coinciden en que la erradicación de la bacteria es benéfica en pacientes con patologías crónicas, sin embargo A, no podría considerar el desarrollo de terapias o tratamientos encaminados a prevenir el desarrollo de las mismas mediante el mantenimiento de las poblaciones bacterianas estables, como sería el uso de *H. pylori* como probiótico, o de extractos de plantas con un efecto atenuante. Sobre este último punto, la dieta parece jugar un papel importante en la aparición de la enfermedad, aunque resulta aún muy aventurado decirlo, cabría la posibilidad de que el consumo de plantas tanto de uso medicinal como comestible pudieran actuar de manera preventiva al desarrollo de patologías crónicas, mediante el efecto atenuante de las “poblaciones de *H. pylori*” dentro del estómago humano<sup>33,35</sup>.

### **1.11. Estudios de plantas con actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori*.**

Antes del descubrimiento de *H. pylori* como un agente etiológico de la gastritis crónica y la úlcera péptica, se creía que estas patologías se debían únicamente a un desequilibrio entre los factores defensivos y los agresivos de la mucosa gástrica, causado básicamente por el exceso de acidez, el estrés, la ingesta de algunos productos como el alcohol, los irritantes y algunos medicamentos<sup>35</sup>. Los estudios de plantas con potencial para aliviar las úlceras eran realizados por lo tanto en modelos de ulceración producidos por métodos químicos y físicos (ligado del píloro, estrés, administración de antiinflamatorios no esteroideos, ácido clorhídrico, alcohol) y las actividades que se reportaban tenían que ver únicamente con efectos gastroprotectores y/o inhibidores de la secreción de ácido<sup>35</sup>.

En 1984 Marshall y Warren propusieron que la gastritis y la úlcera péptica eran producidas principalmente por *H. pylori*, pero es en años recientes que se está buscando una actividad de agentes derivados de plantas (extractos, fracciones o compuestos puros) con una acción directa sobre la bacteria, así como también, se han desarrollado modelos animales en los que el daño es producido únicamente por su infección<sup>33,35,82,169,201</sup>. En el implementado con gerbos (*M. unguiculatus*) se pueden lograr tasas de infección altas, así como la inducción de la gastritis crónica activa, metaplasias y úlceras gástricas<sup>40,90,79,169,203</sup>. Para el caso de la úlcera duodenal, a excepción del trabajo realizado por Ohkusa en 2005 en el que registró una incidencia del 33 %, hasta el momento no se ha logrado que se desarrollen claramente en los animales<sup>149</sup>. Por otra parte, el cáncer gástrico o procesos cancerosos suelen presentarse en una proporción baja en los animales, por lo que se ha llegado a plantear que es aún un mal modelo para el estudio de este tipo de patologías<sup>41,169</sup>.

En el caso de los estudios de plantas con actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori* en el que emplean modelos animales, solo han analizado si los extractos o compuestos son capaces de erradicar a la bacteria dentro del estómago, así como medir algunos parámetros de daño, pero hasta el momento no existe un estudio en el que se haya evaluado su efecto sobre úlceras pépticas producidas directamente por la bacteria<sup>47,81,135,137,154,156,167,207,208,209</sup>. Este punto es importante, ya que se suele inferir que los resultados de gastroprotección de algún extracto o compuesto determinado en modelos de daño producido por métodos químicos o físicos, serán iguales en los que el daño lo induce únicamente *H. pylori*. Por lo tanto, es posible que muchos compuestos no tengan el mismo efecto en los modelos de ulceración causado por la bacteria y se esté cometiendo un grave error al hacer este tipo de inferencias. Para el caso del daño producido por los métodos químicos, éstos lo producen en minutos y su duración es de solo algunas horas o días, además de que los tratamientos se aplican minutos antes de inducirlo<sup>8;25,57, 134</sup>. Para el caso de las úlceras producidas por *H. pylori* son el resultado de un proceso crónico (años en humanos y meses en animales) y persisten mientras la bacteria esté presente, además, que los tratamientos se tienen que suministrar después de que se haya

producido la lesión<sup>40,82,90,149,167,203</sup>. Por otra parte, también se han desarrollado modelos híbridos en los que se infecta a los animales con la bacteria y se produce la úlcera con distintos ácidos<sup>80,130,176</sup>, sin embargo, estos modelos están lejos de simular el escenario real donde el daño es producido únicamente por *H. pylori*.

Para el caso de las lesiones producidas por alcohol, ácido, así como por antiinflamatorios no esteroideos, los principales mecanismos que se analizan y por los que se plantea se lleva a cabo la gastroprotección son por tres clases de factores, los funcionales (secreción de moco alcalino, motilidad y microcirculación), los humorales (canales de K<sup>+</sup> dependientes de ATP, catalasas, superóxido dismutasa, prostaglandinas y óxido nítrico), los neuronales (neuronas aferentes sensibles a capsaicina), así como por la inhibición de la secreción de ácido o neutralización<sup>8,25,57,134</sup>. En este respecto el mecanismo gastroprotector propuesto para el extracto metanólico de la corteza de *A. adstringens*, cuando el daño es causado por etanol, es debido principalmente a que actúan estimulando el óxido nítrico endógeno, así como en menor grado a los sulfhidrilos endógenos y las prostaglandinas<sup>8</sup>. Para el caso del ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico, los sulfhidrilos endógenos son los únicos que participan en el mecanismo gastroprotector<sup>8</sup>. En el caso de la mezcla de ácidos anacárdicos de *A. occidentale* la gastroprotección al daño producido por etanol, es principalmente por mecanismos antioxidantes, ya que los ácidos anacárdicos son capaces de restaurar los niveles de sulfhidrilos, óxido nítrico y las actividades de las catalasas, así como de la superóxido dismutasa<sup>134</sup>. Así también, actúan en menor grado otros mecanismos complementarios que incluyen la activación de las neuronas aferentes sensibles a capsaicina, la estimulación de prostaglandinas endógenas y óxido nítrico, la apertura de canales de K<sup>+</sup> dependientes de ATP, así como el incremento en la microcirculación gástrica<sup>134</sup>.

El primer reporte que se tiene sobre la búsqueda de propiedades inhibitoras del crecimiento de *H. pylori* de plantas es el de Cassel-Beraud y colaboradores en 1991 y es a partir de los últimos cinco años que este tipo de estudios ha aumentado considerablemente<sup>32</sup>. Cabe señalar que en México, no obstante su gran diversidad biológica y su amplia cultura tradicional en el uso de plantas medicinales,

solo existía un estudio realizado por un grupo de investigadores europeos, sobre algunas plantas utilizadas en la medicinal maya yucateca, en el cual identificaron extractos de tres especies con actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori*<sup>6</sup>.

Estudios realizados hasta el 2007 indican que hay un total de 327 plantas estudiadas a nivel mundial tanto de uso medicinal como comestible y de las cuales el 60.8 % presentan un efecto inhibidor del crecimiento de *H. pylori*<sup>35</sup>. El principal inconveniente sobre estos trabajos, es que la mayoría solo se han realizado *in vitro* y las condiciones que se han utilizado presentan una gran variación (tamaño del inóculo, cepa bacteriana, tiempo de incubación, falta de uso de antibióticos de referencia, entre otras) que dificulta la realización de un análisis comparativo de efectividad, o la definición de un intervalo de inhibición significativo<sup>33,35</sup>.

Si se compara la eficiencia obtenida con algunos antibióticos de referencia utilizados en los estudios, solo algunos compuestos puros presentan una eficiencia similar *in vitro* y de los pocos que se han probado *in vivo*, no se ha podido demostrar que erradiquen a la bacteria como lo hace la terapia que actualmente se utiliza<sup>2,10,14,89,112,116,122,125,144,150,183,184,185,189,211</sup>. Aún así, este tipo de estudios son muy prometedores por varias razones: 1.- Presentan compuestos activos con gran diversidad de estructuras químicas, muchas de ellas nuevas y las cuales pueden ser la base para el diseño de fármacos más efectivos, 2.- algunos de ellos han mostrado que son capaces de eliminar cepas resistentes, 3.- pueden reducir los efectos secundarios, 4.- validan científicamente el uso de plantas que se utilizan tradicionalmente para gastritis y úlceras y 5) bajo una nueva propuesta, son la base para el desarrollo de un terapia contra *H. pylori* más selectiva, basada en la regulación de su población, más que en su erradicación<sup>35</sup>.

De acuerdo a la literatura sobre los estudios de plantas con actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori* hasta el momento y considerando a la bacteria únicamente como un patógeno, se pueden identificar cuatro posibles mecanismos por los que se plantea que las plantas medicinales o comestibles pueden estar actuando sobre *H. pylori* y el daño que esta genera al tejido<sup>35</sup>:

1.-*Preventivo de la infección*. En esta categoría tendríamos plantas que se consumen frecuentemente en la dieta, como algunos frutos y especias que evitan que las personas se infecten con *H. pylori*. Un ejemplo de esto se lograría con plantas que contienen cierto tipo de polisacáridos en abundancia, los cuales se plantea que interfieren directamente con el pegado de la bacteria a las células epiteliales<sup>10,11,12,26,27,75,77,102,103,107,108,125,153,172,173</sup>.

2.-*Erradicador*. Es el principal mecanismo que se ha buscado. Se han descrito diversos agentes derivados de plantas que presentan esta actividad en estudios *in vitro*, pero hasta la fecha, ninguno de ellos ha demostrado que erradiquen claramente a la bacteria *in vivo*<sup>10,14,89,111,115,122,125,144,150,183,184,185,189,211</sup>. Aunque hay que señalar que los compuestos puros tienen un gran potencial para ser incluidos en la terapia en combinación con otros agentes derivados de plantas o antibióticos comerciales<sup>91,183</sup>.

3.- *Atenuante*. En este mecanismo se disminuye el número de bacterias o se retrasa su crecimiento. Es el principal efecto que se ha encontrado en los estudios *in vivo*, principalmente con extractos o mezclas herbales<sup>47,81,135,137,154,156,167,207,208,209</sup>. Con base en los resultados obtenidos de plantas con actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori in vivo* hasta el momento, se puede proponer que este es el principal modo de acción de las plantas usadas tradicionalmente sobre esta bacteria.

4.- *Protector*. Algunos extractos y compuestos son capaces de atenuar el daño causado por la infección al disminuir la inflamación y el daño a la mucosa, pero hasta el momento, no existe un solo estudio en el que se haya determinado en úlceras producidas por la bacteria<sup>66,135,156,184,185,189,208</sup>. Hay que señalar que el término antiulceroso se da décadas antes de aceptar a *H. pylori* como el principal agente causal y los mecanismos por los cuales desaparecen las lesiones se han descubierto empleando modelos de ulceración producida por métodos químicos ó físicos, así como también, gran parte de los fármacos antiulcerosos utilizados en el esquema clásico, derivan de este tipo de estudios<sup>25,92</sup>. El uso de un modelo adecuado es importante para



poder determinar si un extracto ó compuesto puede presentar una actividad antiulcerosa, pero hay que estar conscientes de que los resultados obtenidos con una u otra metodología no son comparables y que es factible que el efecto protector determinado en modelos clásicos, no sea el mismo en modelos de daño causado únicamente por *H. pylori*<sup>33,35</sup>.

Para el caso específico de las plantas mexicanas que se utilizan para tratar problemas relacionados con la gastritis y la úlcera, los estudios farmacológicos son pocos y como ya se mencionó, faltan estudios sobre su actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori*<sup>33,35</sup>. Se propone que 3103 especies de plantas superiores son usadas en la medicina tradicional mexicana y de las cuales 1024 se usan para tratar enfermedades del tracto digestivo<sup>7</sup>. Este panorama nos permite tener un campo de investigación muy amplio y prometedor sobre el posible efecto inhibidor del crecimiento de *H. pylori* de estas plantas.

De este vasto grupo de plantas medicinales, una de la más utilizada y comercializada para el tratamiento de la gastritis y la úlcera en nuestro país, es la corteza del “cuachalalate” (*Amphipterygium adstringens*) de la cual se han identificado varios compuestos activos con diversas propiedades terapéuticas, incluyendo actividades antiulcerosas, antiinflamatorias y gastroprotectoras<sup>8,13,138,140,141,142,152,158</sup>, pero no hay estudios sobre su posible actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori*.

### **1.12. *Amphipterygium adstringens* “cuachalalate”.**

Es un árbol dioico endémico de México y Centroamérica perteneciente a la Familia Anacardiaceae de hasta ocho metros de altura, de tronco torcido y corteza de color moreno grisáceo, la cual presenta un exudado blanco cremoso extremadamente astringente y de olor picante<sup>7,163</sup> (figura 6). Se usa tradicionalmente contra el cáncer, úlceras, gastritis, lesiones cutáneas, rozaduras de bebés, golpes, mordeduras o piquetes de animales venenosos, como cicatrizante, para tratar infecciones en la

vagina, contra el frío, para la caída de la matriz y de ovarios, granos genitales, dolor de estómago, infección o inflamación intestinal, para el hígado, la vesícula, contra la tifoidea, dolor de muelas, endurecimiento de las encías, fuegos en la boca, varices, úlceras varicosas, analgésico, contra fiebres intermitentes, paludismo, calentura, caída del cabello, manchas en la piel, gangrena, diabetes, antibiótico y para disolver cálculos renales<sup>7,152</sup>.



**Figura 6.** a, Árboles de “cuachalalate” en los meses de sequía. b, Descortezamiento del árbol y c. Corteza secada al intemperie que es la forma tradicional como se usa. (Fotografías tomadas en el mes de mayo del 2005 en el rancho “El Campeón”, ubicado en la zona limítrofe entre Morelos y Puebla).

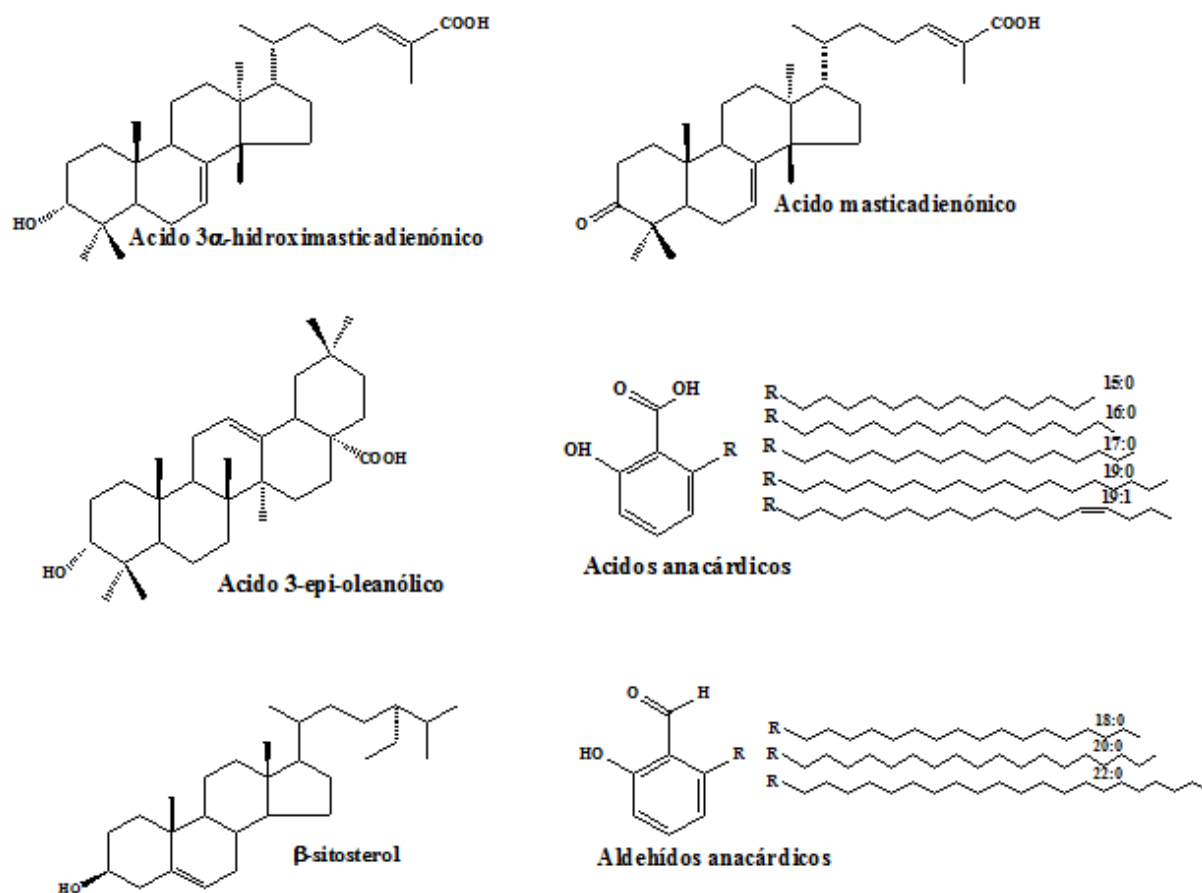
El modo de empleo reportado varía de acuerdo a la zona geográfica, al tipo de padecimiento y a la parte utilizada de la planta. El cocimiento de la corteza en agua o simplemente el remojarla hasta que el líquido tome color, se administra como “agua de uso” para tratar úlceras, cáncer de estómago, gastritis y ciertas lesiones cutáneas, así como también se aplica en forma de lavados vaginales cuando se presentan infecciones, caída de la matriz o de ovarios<sup>7</sup>. En algunos casos se endulza para tratar padecimientos respiratorios, tos, “inflamación de las anginas”, resfriados, tuberculosis, enfermedades

pulmonares<sup>7</sup>. La ingestión o aplicación de la resina se utiliza principalmente para tratar los granos, heridas, llagas o en su caso se pone la corteza en polvo sobre ellas. También la tintura (extracción con alcohol 96°) se utiliza como sustituto del “mertiolate”<sup>112</sup>, así como pueden incorporarse algunas gotas al agua e ingerirse para tratar la gastritis y la úlcera (comunicación personal).

De la corteza del *A. adstringens* se han aislado e identificado 20 terpenos, 2 esteroides (acotilona y  $\beta$ -sitosterol), una saponina de tipo esteroidal (sarsapogenina), una serie de fenoles de cadena larga (ácidos y aldehídos anacárdicos) así como un naftaleno (3-dodecil-1,8-dihidroxi-2-ácido naftico)<sup>8,67,116,124,138,140,141,142,166</sup> (figura 7).

Dentro de las actividades reportadas para la corteza se encuentra el efecto gastroprotector, cuyo primer estudio realizado en un modelo de úlceras duodenales y gástricas producidas por indometacina e histamina, fue hecho por Navarrete y colaboradores en 1990, quienes encontraron una actividad del 11 y 25 % con extractos acuosos a dosis del 4 y 8 %, respectivamente<sup>142</sup>. Posteriormente, se reportó una actividad del 74.5 % a una dosis de 30 mg/K del extracto metanólico sobre úlceras gástricas producidas con etanol absoluto en ratas y se identificó una fracción rica en terpenos con una actividad del 95 % a una dosis de 10 mg/K<sup>140</sup>. En estudios posteriores, se aislaron de dicha fracción los compuestos activos que corresponden al  $\beta$ -sitosterol, a los terpenos ácido masticadienónico, ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico y al ácido 3-epioleanólico<sup>8,13,141</sup>.

La actividad antiinflamatoria se le atribuye al terpeno 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico, el cual es capaz de reducir el edema en ratones en un 93 % después de 3 h a una dosis de 10 mg/K (modelo de edema en oreja de ratas Wistar inducido por TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13acetato)<sup>152</sup>. En un estudio posterior empleando el modelo con ratones CD1 con edema en la pata inducido por reactivo de carragenan, se encontró activo al extracto acuoso y al metanólico, atribuyéndose el efecto tanto al ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico como al masticadienónico con una actividad del 44 % en la reducción del edema a una dosis de 100 mg/K<sup>1</sup>.



**Figura 7.** Principales metabolitos con actividad biológica aislados de la corteza del *A. adstringens*.

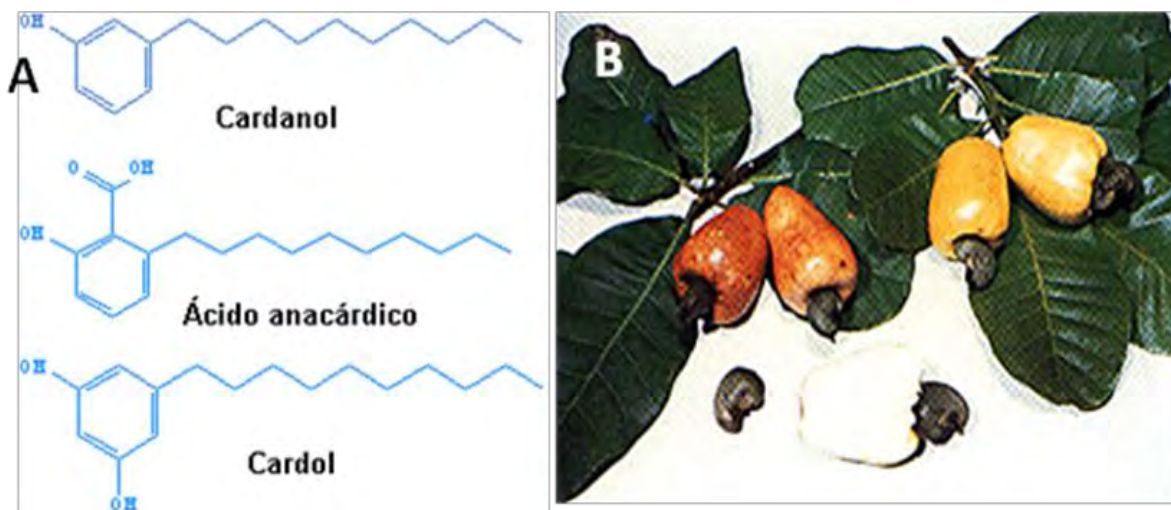
La actividad anticancerígena fue ensayada en ratones trasplantados con adenocarcinomas mamarios, los cuales fueron tratados por siete días inyectando extractos o fracciones aisladas de la corteza del *A. adstringens*. El estudio reveló que los extractos acuosos presentan una actividad antitumoral del 48 %, mientras que los extractos metanólicos tienen una actividad del 54 %. Al analizar ambos extractos, se identificaron una gran cantidad de saponinas esteroidales, por lo que se les atribuyó el efecto antitumoral. Sin embargo, las saponinas aisladas tuvieron una actividad antitumoral menor que el extracto completo, indicando que la actividad antitumoral de los extractos probablemente se deba a un efecto sinérgico, en el que estarían actuando más de un tipo de saponinas u otros compuestos aún no identificados<sup>67,68</sup>. Por otra parte, del extracto acuoso también se aisló una saponina (saponina sin residuo de carbohidrato) identificada como sarsapogenina por su espectro en infrarrojo. Esta molécula no presentó actividad antitumoral, por lo que los autores lo atribuyen al

hecho de perder el carbohidrato<sup>67,68</sup>. Los ácidos masticadienónico y el 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico se les ha reportado un efecto citotóxico, el cual fue determinado por el método calorimétrico de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 difeniltetrazolio)<sup>157</sup>. También, varios terpenos, incluyendo al ácido masticadienólico, el 3 $\alpha$ -hidroximasticadienólico, así como derivados de los mismos, muestran el mismo efecto, pero evaluado en una línea celular de leucemia<sup>116</sup>.

Los estudios de actividad antimicrobiana son pocos, pero se ha reportado que el extracto metanólico inhibe a varias especies bacterianas (*Staphylococcus*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolítica*, *Enterobacter aerogenes* y *Enterobacter agglomerans*) con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) que van de 125 a 200  $\mu\text{g/ml}$ <sup>30</sup>. También, se les ha atribuido un efecto micobactericida (contra *Mycobacterium tuberculosis*) a los terpenos masticadienónico y al 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico con una CMI de 64 y 32  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente<sup>166</sup>.

Una serie de compuestos que han sido ampliamente estudiados (algunos de ellos presentes en la corteza de *A. adstringens*) son los ácidos anacárdicos, los cardoles y cardanoles que suelen englobarse dentro de un grupo comúnmente denominado fenoles de cadena larga (figura 8, tabla 2).

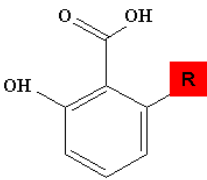
Este tipo de compuestos se encuentran principalmente en géneros pertenecientes a la Familia Anacardiaceae y en el Ginkgo, aunque también se han reportado en algunos miembros de otras familias como la Geraniaceae, Myristiceae, Areaceae y Olaceae<sup>171,197</sup>. Los fenoles de cadena larga son diversos, ya que pueden presentar distintas combinaciones en su estructura básica, como son el largo de la cadena alifática, insaturaciones y posiciones en las mismas, así como distintos sustituyentes en el anillo<sup>78,83,111,124</sup>. Una fuente importante de fenoles de cadena larga son el fruto y el aquenio de un árbol originario de Brasil llamado *Anacardium occidentale*, aunque la principal fuente es el aceite que se extrae de la cáscara de la nuez (353 gr/K) y al que denomina “cashew nut-shell liquid”<sup>194,198</sup> (figura 8). Para el caso de la corteza del *A. adstringens* se han descrito ácidos y aldehídos anacárdicos<sup>124</sup> (figura 7, tabla 7)



**Figura 8.** A. Principales fenoles de cadena larga. B. Aquenio y fruto de *A. occidentale*. La nuez es comestible y en nuestro país la conocemos como nuez de la india.

Para el caso de los ácidos anacárdicos se han descrito diversas actividades biológicas entre las que se encuentran el efecto letal sobre el caracol *Biomphalaria glabratus* (vector de la esquistosomiasis) y las larvas del escarabajo colorado de la papa *Leptinotarsa decemlineata*<sup>93,180</sup>. Así también, una actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Gyrodinium cohnii*, *Euglena gracilis*, *Neurospora crassa*, *Penicillium griseofulvum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus mutans*, *Brevibacterium ammoniagenes*, así como contra *H. pylori*<sup>46,64,78,93,94,96,171</sup>. Una actividad citotóxica sobre diferentes líneas celulares cancerígenas y propiedades antioxidantes<sup>83,95,194</sup>. Por otra parte se ha encontrado que inhiben a las enzimas ureasa, histidincinasa, xantina oxidasa, lipoxigenasa, tirosinasa, glicerol-3-fosfatodeshidrogenasa, prostaglandinsintasa, cicloxigenasa, aldosereductasa y  $\beta$  lactamasa<sup>74,88,96,123</sup>. Para el caso de los ácidos anacárdicos  $C_{15:0}$ ,  $C_{15:1}$ ,  $C_{15:2}$  y  $C_{15:3}$  presentan un efecto desacoplante de la fosforilación oxidativa de mitocondrias de hígado de rata, parecido al del 2,4 dinitrofenol<sup>193</sup>.

**Tabla 2.** Diversidad de algunos ácidos anacárdicos sintetizados y aislados de varias plantas.

 <b>R: largo de la cadena</b>	Número de insaturaciones (posición)			
	0	1	2	3
5	$\Omega$ C <sub>5:0</sub>			
8	$\Omega$ C <sub>8:0</sub>			
10	$\Omega$ C <sub>10:0</sub>			
11				
12	$\Omega$ C <sub>12:0</sub>			
13	$\vartheta$ C <sub>13:0</sub>			
14		$\Theta$ C <sub>14:1</sub> (6)		
15	$\Phi$ C <sub>15:0</sub> $\Gamma$ C <sub>15:0</sub> $\vartheta$ C <sub>15:0</sub> $\Theta$ C <sub>15:0</sub> $\Omega$ C <sub>15:0</sub>	$\Phi$ C <sub>15:1</sub> (8) $\vartheta$ C <sub>15:1</sub> (8)	$\Phi$ C <sub>15:2</sub> (8,11)	$\Phi$ C <sub>15:3</sub> (8,11,14)
16	$\Gamma$ C <sub>16:0</sub> $\Theta$ C <sub>16:0</sub>			
17	$\Gamma$ C <sub>17:0</sub> $\vartheta$ C <sub>17:0</sub> $\Theta$ C <sub>17:0</sub>	$\vartheta$ C <sub>17:1</sub> (10) $\Omega$ C <sub>17:1</sub> (8)	$\Pi$ C <sub>17:2</sub> (8,11) $\Sigma$ C <sub>17:2</sub> (8,11)	$\Pi$ C <sub>17:3</sub> (8,11,14) $\Sigma$ C <sub>17:3</sub> (8,11,14)
18	$\Theta$ C <sub>18:0</sub>	$\Sigma$ C <sub>17:1</sub> (8) $\Theta$ C <sub>18:1</sub> (13)		
19	$\Gamma$ C <sub>19:0</sub>	$\Gamma$ C <sub>19:1</sub> (15) $\Gamma$ C <sub>19:1</sub> (16) $\Sigma$ C <sub>19:1</sub> (12)		
20	$\Omega$ C <sub>20:0</sub>	$\Theta$ C <sub>20:1</sub> (6)		
21		$\Sigma$ C <sub>21:1</sub> (15)		
22	$\Lambda$ C <sub>22:0</sub> $\Theta$ C <sub>22:0</sub>	$\Lambda$ C <sub>22:1</sub> (10)		
23	$\Theta$ C <sub>23:0</sub>			
24	$\Lambda$ C <sub>24:0</sub> $\Theta$ C <sub>24:0</sub>	$\Lambda$ C <sub>24:1</sub> (12)		

$\Phi$ : *Anacardium occidentale*<sup>96,197</sup>.  $\Gamma$ : *Amphipterygium adstringens*<sup>31,124</sup>.  
 $\vartheta$ : Ginkgo<sup>43,83,202</sup>.  $\Lambda$ : *Geranium*<sup>171</sup>.  $\Pi$ : *Anacardium spondias*<sup>202</sup>.  $\Theta$ : *Ozoroa insignis*,  
éster metílico<sup>111</sup>.  $\Sigma$ : *Spondias bombin*<sup>46</sup>.  $\Omega$ : Sintetizados<sup>206</sup>. ( ) Posición de las  
ligaduras en la cadena alifática.

## 2. OBJETIVOS.

**2.1. Objetivo general.** Determinar la actividad inhibidora de la corteza de *Amphipterygium adstringens* sobre el crecimiento de *H. pylori*, con la finalidad de identificar extractos y compuestos activos, asimismo, establecer el potencial terapéutico de la planta.

### 2.2. Objetivos particulares:

- Diseñar una metodología estandarizada *in vitro* que permita obtener resultados confiables para el análisis de la actividad inhibidora del crecimiento de plantas con reconocido uso etnomédico sobre *H. pylori*.
- Determinar la actividad *in vitro* de diferentes extractos orgánicos y acuosos de la corteza de *A. adstringens* sobre el crecimiento de *H. pylori* y seleccionar los extractos de mayor actividad biológica.
- Aislar y purificar los metabolitos secundarios mayoritarios de los extractos bioactivos, mediante un fraccionamiento fitoquímico biodirigido utilizando diversos procedimientos cromatográficos y monitoreando la actividad biológica por el método de cultivo líquido.
- Diseño y montaje de un modelo de infección animal empleando jerbos de Mongolia (*M. unguiculatus*).
- Establecer el efecto inhibidor del crecimiento de *H. pylori* de los extractos y compuestos activos *in vivo*, con la finalidad de corroborar su potencial inhibitorio y determinar su capacidad terapéutica.



### **3. MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### **3.1. Material vegetal.**

Se obtuvieron 2 K de corteza seca y pulverizada de *Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Standl. (Anacardiaceae) en el centro de acopio de plantas medicinales en Jolalpan en el estado de Puebla. La identificación taxonómica fue hecha por la M. en C. Edelmira Linares Mazarí del Jardín Botánico de la UNAM y el espécimen tipo fue depositado en la Colección Etnobotánica del Herbario Nacional de México (MEXU) con el número 1490.

#### **3.2. Muestras de referencia de la corteza de *A. adstringens*.**

Los ácidos masticadienónico, 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico y el 3-epioleanólico, así como el  $\beta$ -sitosterol, una mezcla de aldehídos anacárdicos y otra de ácidos anacárdicos, fueron proporcionados por el grupo de la Dra. Rachel Mata Essayag del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM.

#### **3.3. Análisis cromatográficos.**

Las cromatografías por adsorción en columna se realizaron sobre gel de sílice (grado 60, malla 50-70 Merck). Los análisis de cromatografía de capa fina (CCF) se realizaron según las técnicas convencionales, utilizando diversos sistemas de elución y cromatofolios de sílica gel en placa de aluminio con indicador fluorescente (grado 60, indicador F<sub>254</sub> Merck), con espesor de 0.02 y 3 mm. Las placas se visualizaron bajo luz ultravioleta de onda corta (254 nm) y onda larga (365 nm) y

posteriormente fueron asperjadas con vainillina 1 % (Sigma) disuelta en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y reveladas con aire caliente.

### **3.4. Análisis espectrométricos y espectroscópicos.**

Los estudios espectroscópicos y espectrométricos se realizaron en la Unidad de Apoyo a la Investigación (USAI) del edificio B de la Facultad de Química de la UNAM. Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN<sup>1</sup>H, 300.2 MHz) y de carbono 13 (RMN<sup>13</sup>C, 75.5 MHz) se generaron en un equipo Varian VXR-300S utilizando CDCl<sub>3</sub>, los desplazamientos químicos se reportan en ppm con referencia al tetrametilsilano (TMS). Para el análisis de cromatografía de gases/espectrómetro de masas (CG/EM), se utilizaron derivados metilados, para lo cual se usó una solución de diazol disuelto en éter etílico, para producir el diazometano, el cual a su vez se dejó reaccionar con 10 mg de la mezcla de ácidos anacárdicos I (mAA-I) por 24 h a temperatura ambiente. Con esto se obtuvo 11.1 mg de mezcla dimetilada. Posteriormente, las muestras se inyectaron en un cromatógrafo de gases Agilent 6890N, con un inyector de muestra automático Agilent 7683B, acoplado a un espectrómetro de masas Pegasus 4D LECO. La columna es una HP-5MS 10 cm x 180 cm, con grosor de 0.18 cm. Como gas acarreador se usó helio a 1 ml/min. La temperatura programada fue de 18 a 280 °C. A una energía electrónica de 70 eV. Los constituyentes de los ácidos anacárdicos de la mezcla, fueron identificados por comparación con espectros de masas de librerías de compuestos.

### **3.5. Microorganismos y condiciones de cultivo.**

La cepa de colección de *H. pylori* ATCC 43504 así como los aislamientos con resistencia a antibióticos (metronidazol y amoxicilina) fueron proporcionadas por la Dra. Guadalupe Ayala Aguilar

del Instituto Nacional de Salud Pública de Cuernavaca Morelos. La *H. pylori* 8823, 8822 y N2 son las principales cepas que han sido utilizadas por varios años en el laboratorio de la Facultad de Medicina de la UNAM. La bacteria denominada como 2, es una bacteria no-*H. pylori* aislada de biopsia gástrica humana y la cepa de *Escherichia coli* utilizada es la NM522.

Las cepas *Proteus vulgaris* ATCC 6808 (ureasa alta) y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (ureasa baja) fueron proporcionadas por la Dra. Graciela Castro Escarpulli del Departamento de Bacteriología Médica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN.

Los aislamientos *Aerococcus urinae*, *Bacillus brevis*, *Bacillus sphaericus*, *Corynebacterium pseudogenitalium* 63, *Corynebacterium pseudogenitalium* 61, *Corynebacterium pseudogenitalium* 58, *Staphylococcus simulans* 101, *Staphylococcus simulans* 60 y *Candida guilliermondii*, derivan de este trabajo y provienen de diversas muestras de gerbos de Mongolia.

Para *H. pylori*, así como para los aislamientos se utilizó el medio Brucella (BB) (Difco) y las bases Casman (Ca) (BBLTM) o Mueller Hinton (MH) (Difco), suplementadas con 5 % de sangre de carnero desfibrinada (s) (Microlab) o 0.1 % de  $\beta$ -ciclodextrinas (c) (Sigma). En algunos experimentos se agregó un coctel de antibióticos (plus) para hacer un medio selectivo para *H. pylori*, que consiste en 7.5 mg/L anfotericina B (Sigma), 3,500 U polimixina B (Sigma), 10 mg/L vancomicina (Sigma) y 5 mg/L trimetoprim (Sigma). En algunas condiciones se les agregó 0.01 % de rojo de fenol (Sigma) y 6 % urea (Gibco BRL) para hacerlo diferencial con base a la actividad de ureasa.

En el caso de cultivos líquidos de *H. pylori* así como de los aislamientos, se incubaron a 37 °C con una agitación de 150 rpm en ambiente microaerofílico (10 % CO<sub>2</sub>) y para *E. coli* se usó Luria Broth e incubó a 37 °C a 200 rpm en condiciones aerobias.

### **3.6. Gerbos de Mongolia y ratones.**

Se utilizaron gerbos de Mongolia (*Meriones unguiculatus*) machos convencionales no monitoreados de 4 a 8 semanas de edad, provenientes del bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (BINN), así como de la Facultad de Ciencias de la UNAM (BFC) y del Hospital Infantil de México, Federico Gómez (BHIM).

Se usaron ratones Balb/c machos de 3 a 4 semanas de edad provenientes del BHIM. Los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la UNAM.

### **3.7. Métodos de extracción y separación de compuestos para la corteza de *A. adstringens*.**

#### **3.7.1. Método de Soxhlet.**

30 g de corteza se sometieron a extracción continua por el método de Soxhlet, con volúmenes de 250 ml de diversos solventes, incrementando la polaridad. Se inició con éter de petróleo, seguido por éter anhidro, cloroformo, etanol anhidro y etanol 70 %. Los extractos resultantes se concentraron en un evaporador rotatorio a una temperatura menor de 50 °C. Al residuo final se le hizo una decocción en agua, la cual se dejó hervir por 10 min, se recuperó el sobrenadante y se concentró en evaporador rotatorio a una temperatura de 80 °C.

#### **3.7.2. Maceración.**

1 K de corteza de *A. adstringens* pulverizada se colocó en un frasco de 4 L con 2.5 L de éter de petróleo ó hexano y se dejó macerar por 3 días. Después el disolvente se eliminó en un evaporador

rotatorio a no más de 50 °C. El disolvente que se recuperó y se reutilizó para hacer de 2 a 3 extracciones más cada 24 hrs.

El extracto acuoso de la corteza de *A. adstringens* se obtuvo por decocción de 50 gr de corteza utilizando agua corriente y 5 minutos de ebullición. El extracto se filtro con papel (Whatman No 1), centrifugó a 30,000 rpm durante 10 minutos y posteriormente se liofilizó.

Para el extracto metanólico se uso la misma cantidad de material vegetal, macerándolo por dos días con 400 ml de metanol. El extracto se concentró en el evaporador rotatorio y al mismo material se le repitió la operación tres veces más.

### 3.7.3. Cromatografía en columna y en capa fina preparativa.

Columna 1: 8 mg de extracto de éter de petróleo obtenido por maceración de la corteza se fraccionaron en una columna de 10 x 0.5 cm utilizando gel de sílice como adsorbente. Se eluyó con un gradiente de hexano/AcOEt con volúmenes de 3 ml cada uno y colectando fracciones completas para las polaridades 7:3, 6:4, 4:6 y 3:7, mientras que las demás se hicieron de 0.5 ml (tabla 3).

**Tabla 3.** Fraccionamiento por cromatografía en columna 1.

Sistema de elución	Proporción	Fracciones
Hexano	100	1
Hexano-AcOEt	7:3	2
Hexano-AcOEt	6:4	3
Hexano-AcOEt	4.5:5.5	4-6
Hexano-AcOEt	5:5	7-9
Hexano-AcOEt	4:6	10
Hexano-AcOEt	3:7	11
AcOEt	100	12
A+	100	13

El A+ se refiere a una fracción extra, la cual corresponde al lavado con AcOEt de la resina que quedó en la columna.

Columna 2: 4 gr de extracto de éter de petróleo extraído por maceración y preabsorbido previamente en 4 gr de sílica, se fraccionaron en una columna de 2.4 cm x 53 cm empacada con 85 gr de gel de sílice. Se eluyó con un gradiente de hexano/AcOEt con volúmenes de 35 ml cada uno, colectando fracciones de 3 a 6 ml (tabla 4).

**Tabla 4.** Fraccionamiento por cromatografía en columna 2.

Sistema de elución	Proporción	Fracciones	Fracciones finales
Hexano	100	1- 43	F-I:C2
Hexano-AcOEt	90:10	43-86	
Hexano-AcOEt	80:20	86-107	
Hexano-AcOEt	80:20	108-123	F-II:C2
Hexano-AcOEt	60:40	124-134	F-III:C2
Hexano-AcOEt	60:40	135-146	F-IV:C2
Hexano-AcOEt	60:40	147-170	F-V:C2
Hexano-AcOEt	50:50	171-214	
Hexano-AcOEt	30:70	214-235	
AcOEt	100	236-256	

Cromatografía en placa fina preparativa (CCFP): Las fracciones de la columna 1 se agruparon de acuerdo al patrón de corrimiento similar en CCF. Posteriormente se colocaron en líneas de 5 mm en dos placas de 0.02 mm de espesor y se eluyeron en un sistema con AcOEt. Una de las placas se reveló con vainillina y sirvió de base para marcar la otra en varias regiones, las cuales a su vez se rasparon y resuspendieron en 1 ml de AcOEt. Los compuestos se recuperaron centrifugando las muestras a 14, 000 rpm por 1 min y evaporando el sobrenadante a una temperatura que osciló entre los 50-70 °C. Los compuestos se diluyeron en 4 ml de DMSO y ocuparon 10 µl para el bioensayo de actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori* en cultivo líquido.

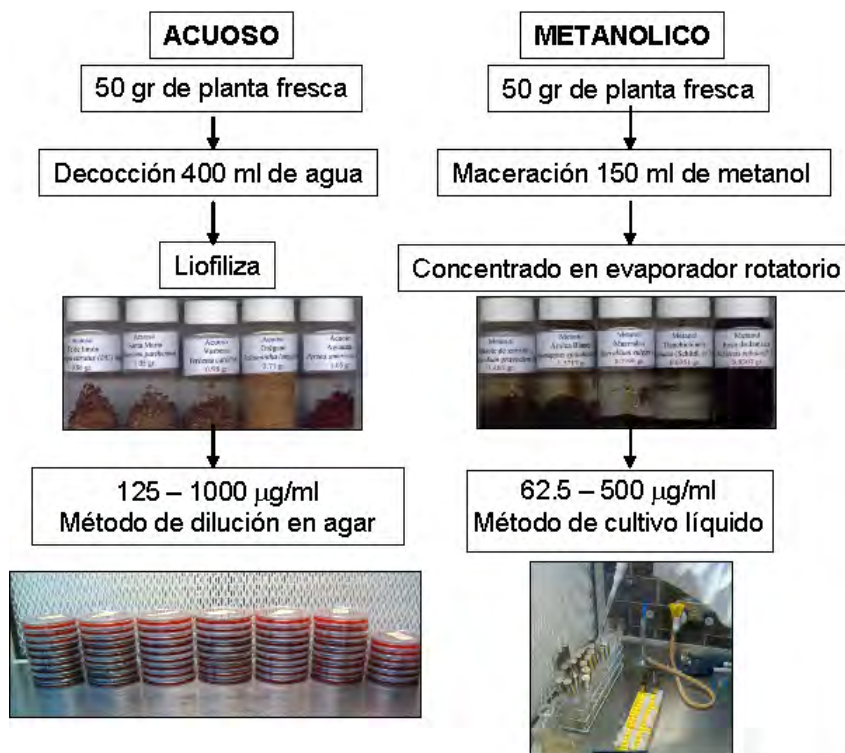
### **3.8. Bioensayos para determinar la actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori* de muestras de referencia, extractos y fracciones.**

#### **3.8.1. Cálculo de la actividad mínima inhibitoria de los extractos acuosos por el método de dilución en agar (DA).**

El método de dilución en agar (DA) es el recomendado por la CLSI/NCCLS (Clinical and Laboratory Standards Institute) para el cálculo de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de antibióticos contra *H. pylori*. En este estudio se siguieron parcialmente las recomendaciones y se utilizó únicamente para el extracto acuoso (tabla 5 y figura 9). La CMI se define como la cantidad mínima necesaria del extracto o compuesto para logra inhibir el crecimiento de la bacteria.

Preparación del agar con extractos:

- Se pesaron 4.2 gr de agar MH para cada concentración a probar y se depositaron en recipientes de vidrio con tapadera metálica, a los cuales se les incorporó una barra magnética.
- Se disolvieron en 170 ml de agua bidestilada caliente y se esterilizaron a 121 °C por 21 minutos. Cada uno de los medios se enfrió en recipientes con agua aproximadamente a 4 °C y se mantuvieron en agitación constante.
- Antes de que el medio se enfriara se les incorporó 0.2 gr, 0.14 gr, 0.1 gr y 0.05 gr de los distintos extractos liofilizados disueltos previamente en 20 ml de agua estéril, para obtener las concentraciones finales de 250 µg/ml, 500 µg/ml, 700 µg/ml y 1000 µg/ml<sup>\*1</sup>
- Una vez que se disolvieron los extractos, se les agregó 10 ml de sangre de carnero desfibrinada fresca y se vaciaron en cajas de Petri<sup>\*2 y 3</sup>. Se dejaron incubar 12 h a 37 °C para quitar el exceso de humedad y descartar la aparición de contaminaciones.



**Figura 9.** Metodología empleada para determinar la actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori* preliminar de plantas.

Preparación de la bacteria y ensayo:

- La cepa de *H. pylori* ATCC 43504 almacenada en viales de 200 µl a -80 °C se sembró por tapete en una caja de agar MH-s a 37 °C en condiciones microaerofilicas, por aproximadamente 24 h<sup>\*4</sup>. Bajo estas condiciones de crecimiento se observó un tapete bacteriano uniforme y translúcido, el cual se cosechó en un tubo de 25 ml, con 2 ml de medio de cultivo MH-c. Posteriormente se midió en el espectrofotómetro realizando una dilución 1/10 (100 µl del cultivo mas 900 µl MH) a una A<sub>660nm</sub> y ajustó a 0.1<sup>\*5</sup>.

- Para realizar la prueba, de nuestro tubo de cultivo con *H. pylori* a 0.1 D.O<sub>660nm</sub> se sembraron por tapete 100 µl por caja con las distintas concentraciones de extractos. Después se incubaron en ambiente microaerofilico a 37 °C de 3 a 10 días para determinar la CMI.<sup>\*6</sup>



Notas:

\*1- En algunos casos en las concentraciones altas no se disuelven, por lo que se tienen que calentar ligeramente en el mechero.

\*2- Cuando un medio está muy caliente y se le agrega la sangre, esta se quema y las cajas se observan de un color más oscuro. Si está muy frío se forman grumos y la concentración de los extractos ya no es la deseada.

\*3- 200 ml de medio rinden aproximadamente 7 cajas Petri de 8.3 cm.

\*4 - Este tiempo de crecimiento puede variar. La CLSI/NCCLS recomienda un subcultivo de 72 horas, pero en nuestro caso vimos que en un menor tiempo de incubación las bacterias son más viables.

\*5- A 0.1 de D.O.<sub>660nm</sub> se tienen de  $10^7$ - $10^8$  CFU/0.1 ml. Esto es calculado por cuenta viable.

\*6 - Tres días es lo que recomienda la CLSI/NCCLS pero en nuestro caso se observaron a los 3, 7 y 10 días.

**Tabla 5.** Condiciones recomendadas por la CLSI/NCCLS para determinar la sensibilidad a antibióticos de *H. pylori* por el método de dilución en agar.

<b>Medio</b>	Agar Mueller-Hinton suplementado con 5 % de sangre envejecida de 2 o más semanas.
<b>Inóculo</b>	$1 \times 10^7$ - a $1 \times 10^8$ UFC/ml (Opacidad de 2, McFarland, obtenido de un cultivo con 2 días de crecimiento en medio sólido).
<b>Incubación</b>	35 °C en atmósfera microaeróbica
<b>Lectura</b>	3 días
<b>Cepa control</b>	<i>H. pylori</i> ATCC 43504
<b>Antibióticos de referencia</b>	Amoxicilina, ciprofloxacina, claritromicina, metronidazol y tetraciclina.

Tomado de Clinical and Laboratory Standart Institute/ National Committee for Clinical Laboratory Standart 2005<sup>44</sup>.

### 3.8.2. Cálculo de la actividad mínima inhibitoria de extractos y compuestos por el método de cultivo líquido (CL).

El método de cultivo líquido (CL) se utilizó para los extractos metanólicos o de polaridades menores, así como para las fracciones y compuestos puros (figura 9).

Preparación de la bacteria, extractos y compuestos:

- Se utilizó la cepa ATCC 43504 la cual se almacenaba en viales de 200  $\mu$ l a  $-80$  °C. Se tomaron de dos a tres viales y se resuspendieron en un matraz nefelométrico de 120 ml con 50 ml de medio MH-c-plus<sup>\*1</sup>, hasta obtener una absorbencia de 40 unidades Klett (UK) (1 ml de cultivo directo  $A_{600} = 0.2$ )<sup>\*2</sup>. Posteriormente se colocaron en la estufa con un agitador a 150 rpm, a 37 °C y en condiciones microaerofílicas. Se dejó crecer aproximadamente 15 h o hasta que alcanzara 50 UK (1 ml de cultivo directo  $A_{600} = 0.27$ ), que corresponde al inicio de la fase logarítmica.
- Los extractos y compuestos se disolvieron en DMSO<sup>\*3</sup>.

Ensayo

- En tubos de ensayo estériles de 18 cm x 2 cm con tapa metálica se agregaron 3 ml de medio<sup>\*4</sup> MH-c, de acuerdo al número de condiciones experimentales, teniendo en cuenta incluir controles con DMSO.
- De cada condición experimental o control se agregó la cantidad necesaria de la muestra a analizar, para obtener la concentración final deseada y posteriormente se midió la  $A_{600}$  inicial de 1 ml de cultivo.
- Se dejaron incubando en ambiente microaerofílico a 37 °C y 150 rpm, de 18 (exponencial tardía) a 25 horas (estacionaria) y se midió la  $A_{600}$  final de 1 ml de cultivo.
- Una vez obtenidas dos mediciones, se obtuvieron las CMI por las diferencias obtenidas entre el cambio de D.O. de los controles y los grupos experimentales<sup>\*5</sup>.

Notas:

\*1- Deben de estar perfectamente resuspendidas, no deben de quedar grumos.

\*2- El volumen inicial del cultivo va a depender del número de condiciones experimentales que se utilicen, pero siempre ajustar a 40 UK.

\*3- El medio no debe de sobrepasar el 1 % de DMSO porque una concentración mayor afecta al crecimiento de las bacterias.

\*4- No deben de agregarse más de 4 ml de medio ya que no se agitan bien y no llega suficiente aire a las bacterias.

\*5- Hay que señalar que con este método la sensibilidad de los antibióticos comerciales disminuye notablemente.

### **3.8.3. Cálculo de la actividad mínima bactericida de la mezcla de ácidos anacárdicos contra *H. pylori***

Se siguieron los mismos pasos que para el cálculo de la CMI en cultivos líquidos. De los 2 ml de cultivo que quedaron después de la primera lectura, se tomaron alícuotas de 100 µl para realizar cuenta viable aproximadamente cada cuatro horas, hasta llegar a 25 h de incubación o más.

El medio utilizado para la cuenta viable fueron cajas de agar Ca-c, las cuales se dejaron incubando por 10 días. Después de este tiempo se cuantificaron las colonias y se obtuvieron las UFC/ml. Con este dato se pudo calcular la concentración mínima bactericida (CMB), la cual se define como la concentración mínima a la cual se mata el 100 % de las bacterias.

### **3.9. Análisis de la actividad bacteriolítica de la mezcla de ácidos anacárdicos por microscopía electrónica de transmisión.**

Cultivos de *H. pylori* de 3 ml en medio MH-c con 50 UK se les agregó la mAAref a concentraciones finales de 12.5, 30 y 50 µg/ml. Se tomaron alícuotas de 0.1 ml de las concentraciones de 50 µg/ml a los tiempos 0.5, 1 y 2 h; para 12.5 y 30 µg/ml a los tiempos 8 y 18 h, así como para el control con DMSO a los tiempos 0, 8 y 18 h.

Para fijar las bacterias se centrifugaron las alícuotas en tubos de plástico nuevos de 1.5 ml a 6,000 rpm por 5 min. Posteriormente la pastilla se resuspendió en 100 µl de glutaraldehído al 3 % recién preparado frío y se aforó a un volumen de 1 ml. Antes de haber transcurrido 12 h se procesaron en la Unidad de Microscopía Electrónica del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

### **3.10. Análisis de toxicidad.**

#### **3.10.1. Citotoxicidad de la mezcla de ácidos anacárdicos determinado por el método de MTT en linfocitos humanos.**

La evaluación de los efectos citotóxicos de la mezcla de ácidos anacárdicos, se llevó a cabo en linfocitos humanos de sangre periférica y se determinó por el método colorimétrico de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 difeniltetrazolio):

- Los linfocitos se obtuvieron de una muestra de sangre de un donante en condiciones asépticas.
- En un tubo de 15 ml se añadió una parte de ficoll (histopaque) y dos partes de sangre.
- Se centrifugaron a 2000 rpm por 25 min, se tomó el anillo de linfocitos y se agregaron a un tubo nuevo con 10 ml de medio RPMI1640 (sigma).
- Se centrifugaron a 1,200 rpm por 7 min y se quitó el sobrenadante hasta dejar un volumen de 0.5 ml.
- Posteriormente se agregaron 2 ml de medio RPMI1640 (sigma) y se ajustó la solución a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml con 10 % de suero fetal bovino inactivado.
- Se sembraron en cajas de 96 pozos 200 µl de suspensión celular ( $2 \times 10^5$  células/pozo).
- La mezcla de ácidos anacárdicos se determinó a concentraciones de 0.01, 0.05, 0.1, 1, 5, 10 y 50 µg/ml en un volumen final para cada una de 200 µl. Se dieron tiempos de incubación de 3, 24 y 48 h por triplicado.

- El bromuro difeniltetrazolio se disolvió en PBS 1X a una concentración de 5 µg/ml y se esterilizó por filtración. Se agregaron 20 µl en cada pozo después de transcurrido el tiempo de incubación con la mezcla de ácidos anacárdicos y se incubaron por 3 h más a 37 °C.
- Posteriormente se agregaron 100 µl de DMSO por pozo para disolver los cristales y se leyó la  $A_{545\text{nm}}$ .
- Con los datos se calcula el porcentaje de viabilidad, en los que se considera el 100 % al control tratado únicamente con DMSO.

### **3.10.2. Análisis de toxicidad aguda de los extractos de *A. adstringens* por el método de Lorke.**

Se determinó la toxicidad aguda de los extractos acuoso, metanólico y hexánico de la corteza de *A. adstringens*. En la primera etapa se usaron tres animales por condición como lo marca el método, a concentraciones de 10, 100, 1000 mg/k, así como el vehículo. Con base en los resultados obtenidos en la segunda etapa se usaron las concentraciones de 1600, 2900 y 5000 mg/k. El volumen de inoculación máximo fue de 0.7 ml. Los extractos acuosos se disolvieron en agua corriente, los hexánicos y los metanólicos en aceite de canola. En las concentraciones altas en las que no se lograba solubilizar se agregó Tween 80 al 0.2 %.

### **3.11. Análisis de la presencia de compuestos activos de la corteza de *A. adstringens* en extractos acuosos.**

Se analizó la presencia de los terpenos ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico y masticadienónico, así como de la mAA en dos extractos acuosos preparados de la manera tradicional y recomendados para tratar la gastritis y la úlcera.

Método 1: 6 trozos de corteza se maceraron por 12 h en 400 ml de agua corriente.

Método 2: 6 trozos de corteza se hirvieron por 5 min (decocción) en 400 ml de agua corriente.

Para ambos casos, la mitad del extracto se centrifugó a 30,000 rpm durante 10 minutos y filtró (papel filtro Whatman # 1), mientras que la otra solamente se decantó. Posteriormente, se liofilizaron y al producto final se extrajo con 200 ml de éter de petróleo, el cual se eliminó posteriormente usando un evaporador rotatorio. Los distintos extractos se analizaron utilizando CCF y comparando con muestras auténticas de ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico y masticadienónico, así como de la mAA.

### **3.12. Relación estructura-actividad de fenoles de cadena larga.**

Usando el método de CL se determinó la actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori* de los siguientes compuestos a las concentraciones de 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200  $\mu$ g/ml, disueltos en DMSO por duplicado:

Anillos: ácido benzoico (242381 Sigma-Aldrich), ácido salicílico (247588 Sigma-Aldrich), ácido parahidroxibenzoico (H2005 Aldrich), aldehído parahidroxibenzoico (S356 Aldrich) y ácido gálico (G7384 Sigma).

Compuestos relacionados: vainillina (V-2375 Sigma), ácido cinámico (C80857 Aldrich), ácido caféico (C0625 Sigma).

Cadenas: los alquenos trans 2-hexenal (13265Aldrich) y trans 2-octenal (269956 Aldrich), los alcanos hexanal (115606 Aldrich) y octanal (05608 Aldrich).

Fenoles de cadena larga: la mezcla de ácidos (mAAref) y aldehídos anacárdicos (mAL) son las muestras de referencia originales que nos proporcionaron.

### **3.12.1. Separación de la mezcla de ácidos anacárdicos de referencia por cromatografía líquida de alta presión HPLC.**

100 mg de mAref se sometieron a separación por HPLC utilizando una columna C18 de 25 cm x 0.4 cm y 5 micras de partícula (Beckman), con un gradiente de elución isocrático de acetonitrilo/agua. Por el tamaño de la columna, la muestra se dividió y corrió diez veces. Los picos fueron colectados en fracciones para ser concentradas en el evaporador rotatorio y posteriormente se liofilizaron. Solo a 5 picos se les realizó RMNH<sup>1</sup> y/o <sup>13</sup>C para su caracterización.

### **3.13. Desarrollo de un modelo animal de infección por *H. pylori* en *M. unguiculatus*.**

#### **3.13.1. Inoculación de los animales.**

Los animales se mantuvieron en el BINN con agua acidificada (pH 2.3-2.4) y alimento genérico para roedores en cama de aspen de Alamo (Shaven de Northwestern). Para el caso de los animales del BHIM toda la metodología se realizó en las instalaciones del Hospital Infantil De México, Federico Gómez.

- Siete días antes de la inoculación se trasladaron al Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM a jaulas con un sistema anticoprofitismo (piso con malla metálica 0.8 cm<sup>2</sup>). Se mantuvieron en estas condiciones hasta alcanzar el tiempo de infección.

- Se dio un tiempo previo a la inoculación de 24 h con acceso únicamente a agua estéril.

- De un tapete bacteriano incubado 24 h en cajas de agar MH-s se ajustó a 0.2 A<sub>600nm</sub> en BB para obtener una suspensión con 10<sup>9</sup> UFC/0.5 ml.

- Se inocularon por medio de una cánula metálica 0.5 ml de la suspensión anterior por cada animal y se mantuvieron en ayuno 4 h más.

- Se repitieron estos pasos tres veces (o más), dejando intervalos de 20 h.
- Se dio un tiempo de infección de cinco semanas a dieciocho meses.
- Posteriormente, los animales se dejaron en ayuno por 24 h y se sacrificaron por dislocación cervical.
- Se extrajo el estómago y abrió por la curvatura mayor, después se raspó con un estilete la mucosa y se resuspendió en 2 ml de medio BB-c.
- Se tomaron 0.1 ml y se realizaron diluciones seriales de 1/2 y 1/5 hasta  $1 \times 10^{-6}$  en un volumen de 1 ml.
- Posteriormente se sembraron en cajas de agar Ca-s suplementada 7.5 mg/L anfotericina B (Sigma), 3,500U polimixina B (Sigma), 10 mg/L vancomicina (Sigma) y 5 mg/L trimetoprim (Sigma).
- Al cabo de 7 a 10 días de incubación se seleccionaron aquellas colonias que podrían corresponder a *H. pylori* y se les determinó la actividad de ureasa, oxidasa y catalasa, así como también se les examinó al microscópico óptico tiñéndolas con Gram.

### **3.13.2. Grupos experimentales.**

*Grupo I.* Trece gerbos machos provenientes del BINN se dividieron en tres grupos, uno control con 3 animales y dos experimentales con 5 animales respectivamente. Uno de ellos se inoculó con *H. pylori* ATCC 43504 y el otro con el aislado gástrico M2. Se dio un periodo de infección de cinco semanas.

*Grupo II.* Cuatro gerbos del BINN con 10 semanas de haber sido inoculados con *H. pylori* 43504, se reinocularon seis veces más con un cultivo de la misma cepa pero que sobrepasaba las  $10^9$  UFC. Se dieron dos semanas más de infección y analizó la presencia de *H. pylori* por la Prueba Rápida en Disco de Papel (PRDP).

*Grupo III.* Se realizó un análisis histológico de 3 animales provenientes del BINN con 9 semanas de infección con *H. pylori* ATCC 43504 y 3 provenientes del BFC. A cada laminilla se le



incorporó un corte de biopsia de paciente infectado con *H. pylori* como control positivo y se tiñeron con Hematoxilina-eosina y Warthin-Starry.

*Grupo IV.* Un total de 80 animales se inocularon con la cepa *H. pylori* ATCC 43504 y se mantuvieron en el BHIM durante un tiempo de infección de 18 meses. A 11 animales se les determinó la infección por un análisis macroscópico del tejido, prueba rápida en urea (PRU) y cultivo aplicando la PRDP. Se emplearon 9 animales inoculados únicamente con medio de cultivo, como controles negativos.

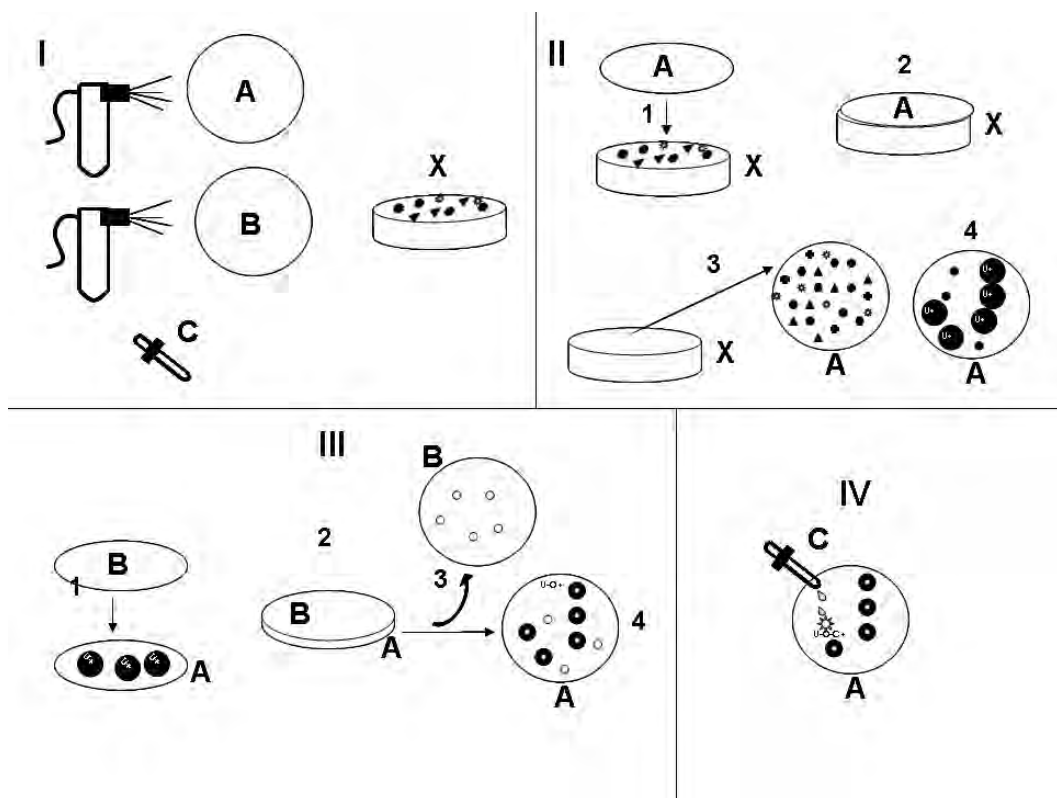
### **3.14. Prueba rápida en disco de papel (PRDP).**

*Transferencia de las colonias al papel y actividad de ureasa.* Con un aspersor para cromatografía se aplicó en un disco de 8.3 cm de papel filtro del número 1 (Whatman) una solución que contenía 0.02 % de azul de bromotimol (Merck 3026), 0.05 % de rojo de fenol (Sigma 114529) y 6 % de urea (Gibco BRL 15505), ajustada a un pH de 3 a 4.

El disco se dejó secar por 40 segundos y se colocó sobre la placa con cultivo hasta que volvió a humedecerse, posteriormente se desprendió y se registró la actividad de ureasa de las colonias en el disco, la cual es positiva cuando forman un halo de color rosa alrededor de las mismas.

*Determinación de la actividad de oxidasa.* En el momento de realizar la prueba se preparó una solución de 0.25 % tetrametilfenilendiamina (Sigma T7394) en agua (reactivo de Kovacs), la cual se asperjó sobre otro disco de papel con las mismas características que el anterior. Sin dejar que se secase por completo se colocó sobre el disco que se utilizó para determinar la actividad de ureasa, del lado donde se encuentran las colonias teniendo cuidado de no presionar. Se dejaron reaccionar 15 segundos y se separaron. En el disco donde se dio la actividad de ureasa se determinó la formación del patrón de reacción (PR) mostrado por las colonias de *H. pylori*, el cual se caracterizó por la formación de un halo rosa con un centro azul.

*Determinación de la actividad de catalasa.* Esta prueba se realizó únicamente en las colonias ureasa-oxidasa positivas, en las cuales se agregó una gota de peróxido de hidrógeno a la vez que se realizó el conteo de colonias. La reacción de catalasa fue positiva cuando se presentó la formación de burbujas en los primeros dos segundos. Los pasos de la prueba se encuentran ilustrados y detallados en la figura 10.



**Figura 10.** Cuadrante I muestra los elementos que integran la PRDP, donde la letra A corresponde al disco impregnado con la solución para determinar la actividad de ureasa. La letra B corresponde al disco impregnado con la solución para determinar la actividad de oxidasa. La letra C hace referencia mediante un gotero a la solución de peróxido de hidrógeno para determinar la actividad de catalasa y por último la letra X indica la placa de agar con antibióticos selectivos para *H. pylori*, donde fue inoculada la muestra y después de varios días de incubación contiene colonias diversas, incluyendo de *H. pylori*. El cuadrante II muestra los pasos a seguir para realizar la prueba de ureasa: los números 1 y 2, muestran la colocación del disco A sobre la placa de agar X con las colonias bacterianas para conseguir su transferencia al disco A; el número 3 representa el paso de la separación del disco A con las colonias bacterianas; y el número 4, indica en el disco A, la formación de halos de color rosa intenso únicamente en las colonias con actividad de ureasa alta como es *H. pylori*. El cuadrante III muestra los pasos a seguir para realizar la prueba de oxidasa, donde los números 1 y 2, esquematizan

lo colocación del disco B sobre el disco A donde ya se determinó previamente la actividad de ureasa; el número 3 esquematiza la separación de los discos quedando en el disco B las colonias con actividad de oxidasa baja, mientras que en el número 4 muestra en el disco A, solo aquellas colonias con actividad de oxidasa alta las cuales viran a color azul, pero únicamente las de *H. pylori* presentan un halo rosa, lo que en conjunto da el *patrón de reacción* para distinguir a las colonias de *H. pylori*. El *cuadrante IV* esquematiza la determinación de la actividad de catalasa, que consiste en agregar una gota de peróxido de hidrógeno a las colonias del disco A que muestren el patrón de reacción y así corroborar por la tercer prueba que sean colonias de *H. pylori*, a la vez que se cuantifican. La producción de burbujas de la colonia en los primeros segundos se considera como ureasa-oxidasa-catalasa positiva.

#### **3.14.1. Aislamiento de microbiota del *M. unguiculatus*.**

De dos gerbos del BFC se obtuvieron las siguientes muestras: el estómago y el ante-estómago así como el bolo alimenticio de cada una de estas regiones, 2 cm de duodeno de la porción cercana al píloro y 40 mg de excremento fresco colectado del intestino grueso. Las muestras fueron homogenizadas en 2 ml de medio BB sin antibióticos y se realizaron diluciones seriales de 1 ml 1/2 (a excepción del duodeno (1/5) y excremento (1/10)). 0.1 ml de estas diluciones se sembraron en placas de agar MH-s. Después de siete días de incubación se obtuvieron los aislamientos y se realizó una selección preliminar con base a la morfología y tinción de Gram.

#### **3.14.2. Determinación de actividad de ureasa, oxidasa y catalasa de los aislamientos con la PRDP.**

Los aislamientos seleccionados se ordenaron en cuatro grupos de acuerdo a la velocidad de crecimiento de las colonias: G1= 12 h, G2= 24 h, G3= 48 h y G4= > 48 h. Alrededor de diez muestras por caja, se sembraron por punto en agar MH-s sin antibióticos y fueron incubadas en ambiente microaerofílico, para el caso de G1 por 12 h y para G2-G4 por 24 h. Cada caja se hizo por triplicado y se le aplicó la PRDP.

### **3.14.3. Determinación del patrón de reacción de colonias ureasa y/o de oxidasa positiva en la PRDP.**

Aquellas bacterias que presentaron actividad de ureasa y/o de oxidasa positiva se les analizó el PR que presentaba una colonia individual, para lo cual se sembraron por agotamiento en cajas de agar MH sin antibióticos. Se dejaron incubar de 12 a 48 h y se les aplicó la PRDP.

### **3.14.4. Identificación de algunos microorganismos aislados del *M. unguiculatus*.**

Se seleccionaron ocho aislamientos bacterianos que mostraron una actividad de ureasa, los cuales fueron identificados por la Dra. Graciela Castro Escarpulli del Departamento de Bacteriología Médica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN. Inicialmente se designaron con base al criterio de Cowal y Steel en el grupo bacteriano al que pertenecían e identificaron posteriormente por el método miniaturizado BBL Crystal™ GP-ID. Para el caso en particular de algunas colonias no bacterianas se utilizó el método miniaturizado API-20 C AUX.

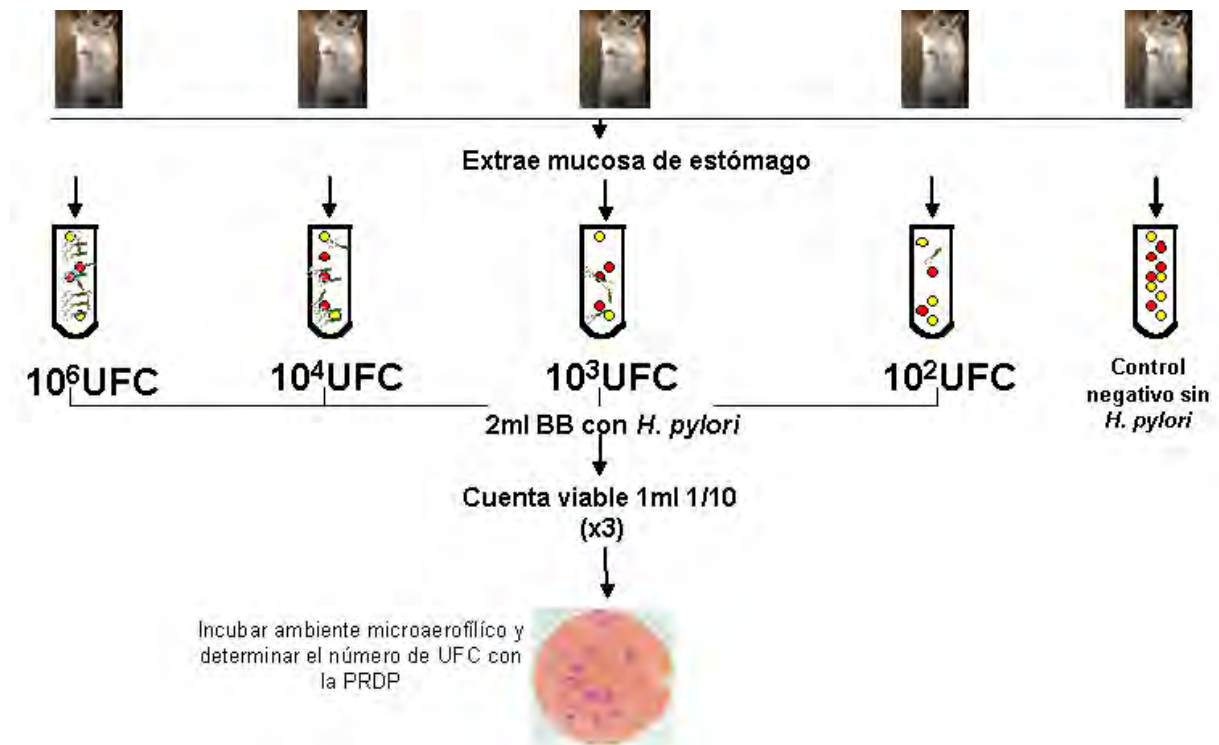
### **3.14.5. Determinación del número de *H. pylori* agregadas a muestras de estómagos de *M. unguiculatus* utilizando la PRDP.**

Cinco gerbos provenientes del BFC se dejaron en ayuno por 24 h y se les extrajo los estómagos teniendo cuidado de desechar el antestómago. Posteriormente, a cada uno de ellos se les raspó la mucosa con una cánula metálica y junto con los restos del estómago se homogenizaron de manera independiente en cinco tubos con 2 ml de medio BB, los cuales contenían a su vez  $10^6$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  y 0 UFC de *H. pylori* (figura 11). Para el conteo en placa se realizaron diluciones seriales de 1

ml 1:10 sembrando 0.1 ml en placas MHS-plus, Cas-plus y Cac-plus por triplicado. Se incubaron por cinco días y se determinó el número de UFC/estómago mediante la aplicación de la PRDP.

### 3.14.6. Aplicación de la PRDP a muestras de agua corriente.

A un cultivo de *H. pylori* ATCC 43504 ajustado a una  $A_{600nm}$  de 0.1, se le realizaron diluciones seriales 1/10 hasta  $10^{-6}$  en muestras de agua corriente de la Ciudad Universitaria de la UNAM, para simular muestras con 100, 1000 y 10,000 UFC/ml de *H. pylori*. Cada una de las diluciones se sembraron por triplicado en cajas de agar Ca-s suplementada con 3,500 U polimixina, 10 mg/L vancomicina, 7.5 mg/L anfotericina y 5 mg/L trimetoprim. Se incubaron en condiciones microaerofílicas por 7 días y se aplicó la PRDP.



**Figura 11.** Diagrama de recuperación y cuantificación usando la PRDP de *H. pylori* en estómagos en el que se les agregó la bacteria en diferentes cantidades.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 4.1. Desarrollo de una metodología *in vitro* para determinar la actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori* de plantas.

Un problema que presentan los estudios de plantas con actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori* a nivel mundial, es la falta de una metodología *in vitro* estándar, que permita señalar un resultado significativo, así como realizar comparaciones de actividad entre distintos grupos de trabajo<sup>33,35</sup>. A este respecto, en algunas publicaciones se han empezado a considerar las recomendaciones hechas por el CLSI/NCCLS<sup>44</sup>, sin embargo presentan el inconveniente de que están diseñadas para el análisis de solo algunos antimicrobianos y no para extractos complejos o fracciones derivados de plantas, para los cuales no siempre son adecuadas, como se demuestra con los resultados que más adelante se presentan<sup>49,62,76,113,143,145,146,178,210</sup>.

Dentro de este contexto, uno de los objetivos particulares del presente proyecto, planteaba la implementación de un bioensayo *in vitro* que estandarice las metodologías utilizadas para determinar actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori* en extractos de plantas. Después de investigar y probar los diversos métodos reportados en la literatura, se logró establecer una metodología apropiada que permite conocer de una manera confiable si una planta es activa, en comparación con otras metodologías que se han empleado hasta el momento<sup>6,32,78,114,115,143,146</sup>.

En nuestro grupo, la búsqueda de actividad *in vitro* se basa en un criterio etnobotánico y consiste en analizar la actividad de los extractos acuosos con el método de DA y los metanólicos con el de CL. Aunque antes de esta tesis se empezó a utilizar para otros trabajos realizados en el laboratorio, en ninguno de ellos se explica el fundamento del diseño, el cual de manera breve toma en cuenta los siguientes puntos<sup>34,69,84</sup>.

- 1.- El modo de empleo tradicional de las plantas medicinales utilizadas para tratar la gastritis y la úlcera es únicamente por vía oral.
- 2.- Los tipos de extractos a analizar son el acuoso y el metanólico, ya que para el caso del primero es la principal forma de uso, mientras que el segundo se consideró porque en algunos casos se reporta el uso de tinturas extraídas con alcohol.
- 3.- Con base a los resultados obtenidos en este estudio, el método de DA resultó ser adecuado para determinar la actividad inhibidora del crecimiento de extractos acuosos y el CL para extractos metanólicos. Es importante señalar que ambas metodologías son independientes y no son comparables.
- 4.- El intervalo de inhibición significativo: la concentración máxima probada para cada método es diferente, ya que está en función de la máxima solubilidad alcanzada por los extractos en los disolventes empleados, que son agua (1000 µg/ml) y DMSO (500 µg/ml). La definición de los intervalos de inhibición siguen siendo aún arbitraria y se basaron en la mayor y menor actividad registrada para un total de 120 extractos analizados<sup>69,34,84</sup>.
- 5.- Debido a la alta sensibilidad que presenta *H. pylori in vitro* y a la variación entre cepas: se sigue la recomendación de la CLSI/NCCLS para determinar la sensibilidad de antimicrobianos sobre la cepa de colección ATCC 43504, a un número de 10<sup>8</sup>UFC, así como la incorporación de dos antibióticos de referencia, la amoxicilina por tener la CMI más baja y el metronidazol por la CMI más alta registrada. No se utiliza el método de McFarland para ajustar el número de bacterias y se sustituye por el conteo en placa, el cual permite conocer el número de bacterias viables. También, dicha comisión recomienda el uso de medios suplementados con sangre envejecida, sin embargo esto afecta a la viabilidad, por lo cual en el bioensayo de DA usamos sangre fresca. Así también, se recomienda leer las placas al cabo de tres días pero la metodología estandarizada en este trabajo señala la lectura de placas hasta los 10 días.

Bajo estas condiciones experimentales la corteza de *A. adstringens* presenta una actividad *moderada*, tanto para el extracto metanólico (250 µg/ml) como para el acuoso (500 µg/ml). Durante el análisis de 106 extractos de plantas que se utilizan para tratar desordenes gastrointestinales en la medicina tradicional mexicana, se encontraron varias con una mayor actividad *in vitro*, sin embargo a pesar de esto se trabajó con la corteza de *A. adstringens*<sup>34</sup> (anexo artículo), ya que es una de las principales plantas usadas en la medicina tradicional mexicana para tratar la gastritis y la úlcera.

## **4.2. Separación e identificación de compuestos inhibidores del crecimiento de *H. pylori* de la corteza de *A. adstringens*.**

### **4.2.1. Método de Soxhlet.**

Como primer paso para separar e identificar los compuestos activos de la corteza de *A. adstringens*, se realizó una extracción continua basándonos en un estudio hecho por González y Delgado en 1962<sup>67</sup>. El material seco y pulverizado se extrajo con éter de petróleo, seguido por éter anhidro, cloroformo, etanol anhidro, etanol 70 % y agua (figura 12). Al analizar la actividad de los extractos en CL, los más activos resultaron ser los extractos de éter de petróleo y anhidro, con inhibiciones del 92 al 101 % a concentraciones de 16 y 160 µg/ml respectivamente (figura 13). Los únicos en los que se pudo calcular una CMI, fueron el extracto de éter de petróleo con 160 µg/ml y el extracto acuoso con 166µg/ml. También, se registró una actividad del 75 al 95 % de inhibición con 166 µg/ml de los extractos de cloroformo, etanol 70 % y etanol anhidro.

La actividad mostrada por los extractos de éter y cloroformo, nos indican que él o los compuestos activos se pueden extraer mayoritariamente con este tipo de solventes. Así como también, la CMI de 166 µg/ml mostrada por el extracto acuoso estaría indicando la presencia de compuestos

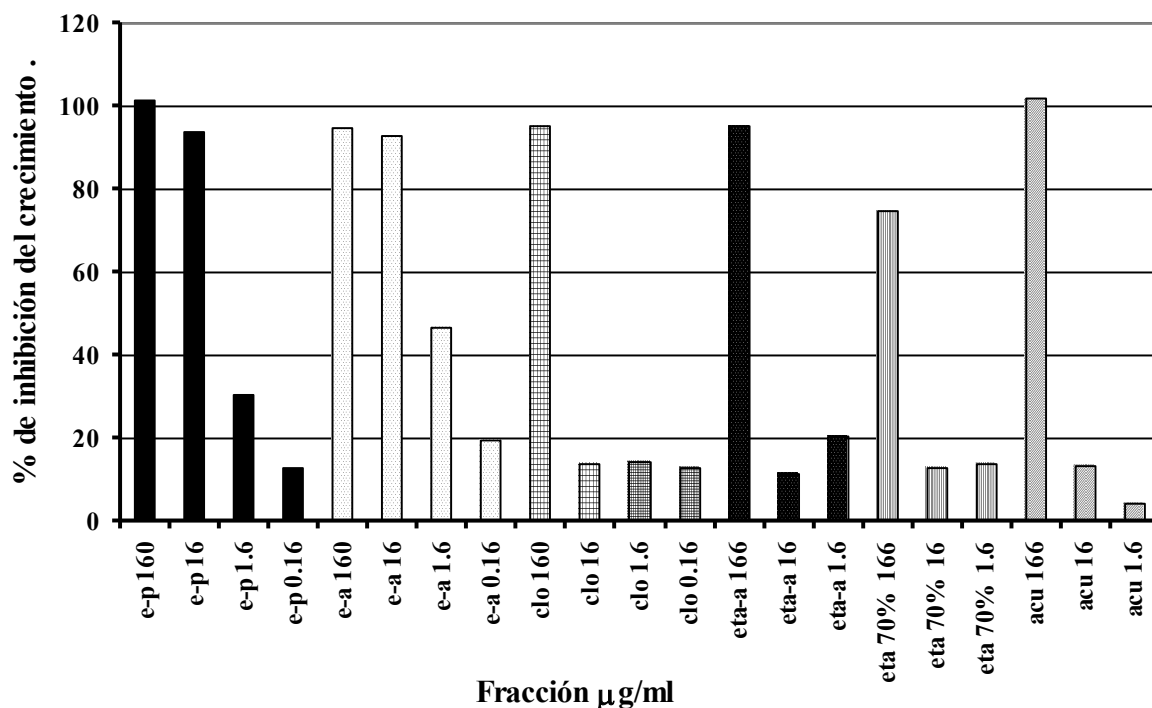


polares activos. Al respecto hay que señalar que uno de los problemas que se tuvo al intentar analizar los extractos acuosos en CL, es que a concentraciones altas, la turbidez de los mismos afecta la medición en el espectrofotómetro, de tal manera que en este experimento en particular, no se puede concluir si dicha actividad es debida a este efecto o a compuestos que solo se pueden extraer en agua.



**Figura 12.** A: Diagrama de flujo de los pasos de la extracción continua con diferentes solventes. B: Aspecto de las fracciones y su rendimiento.

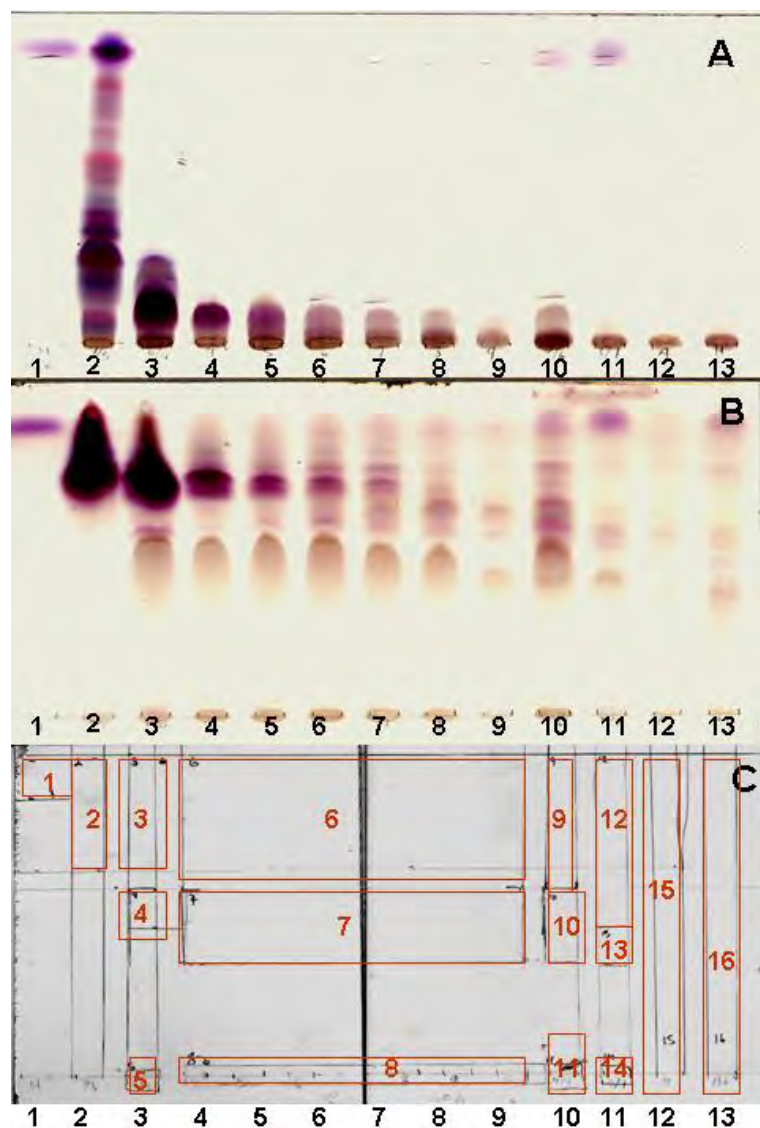
Para ver si esta inhibición tuviera algún grado de especificidad para la bacteria, también se determinó la actividad de las fracciones sobre *E.coli* NM522, a una concentración máxima de 166 µg/ml. Los resultados mostraron que únicamente el extracto de etanol anhidro y el de etanol 70 % presentaron una inhibición del 47.9 y 21.6 %, respectivamente (Datos no mostrados), lo cual sugiere una cierta selectividad de los extractos para inhibir a *H. pylori*, aunque no se debe de descartar que esto puede ser debido a que *H. pylori* es una bacteria de difícil crecimiento lo que la hace más sensible *in vitro*, con respecto a *E. coli*.



**Figura 13.** Efecto inhibitor del crecimiento de *H. pylori* de las fracciones obtenidas a partir de la corteza de *A. adstringens*, usando un método extracción continua. e-p: éter de petróleo, e-a: éter anhidro, clo: cloroformo, eta-a: etanol anhidro, eta 70 %: etanol 70 % y acu: extracto acuoso. Para este experimento se utilizó la cepa *H. pylori* ATCC 8823.

#### 4.2.2. Fraccionamiento en columna y CCFP.

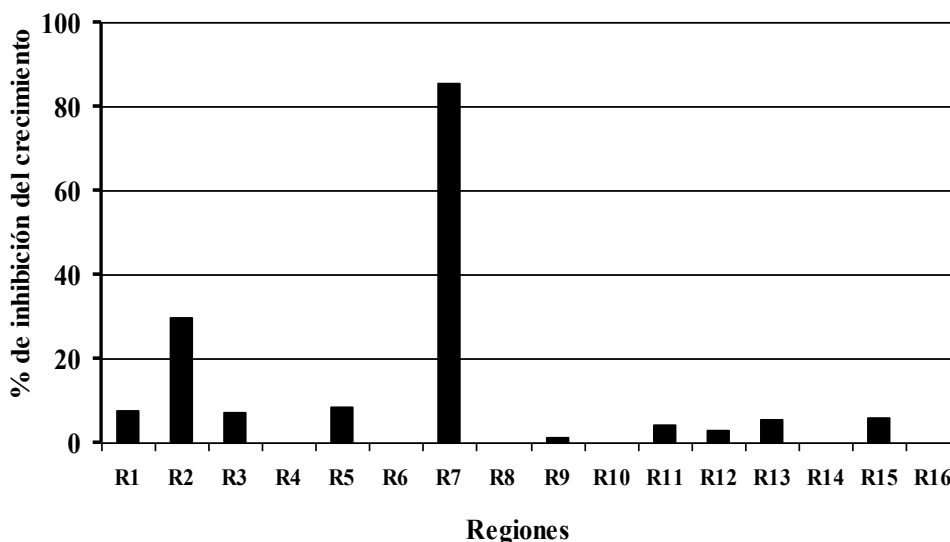
Con este resultado se procedió a la separación de los componentes activos presentes en un extracto de éter de petróleo, mediante un fraccionamiento en columna (columna 1). Se colectaron un total de 13 fracciones (figura 14a), las cuales se recromatografiaron en dos placas y se eluyeron con AcOEt (figura 14b y c). Una de las placas se reveló con vainillina (figura 14b) y se usó como base para dividir a la otra en 16 regiones de acuerdo al patrón de elución de los compuestos (figura 14c). La actividad inhibitora del crecimiento de *H. pylori* de cada una de estas regiones se determinó en CL, encontrándose una zona con la mayor inhibición en el bioensayo (85.7 %) el cual se denominó *región 7* (figura 15). También se registro una actividad del 30 % en la región rica en terpenos (*región 2*), indicando que existen otros compuestos activos (figura 15).



**Figura 14.** Placas cromatográficas de las 13 fracciones. A eluida con hexano/AcOEt 8:2 y B con AcOEt, reveladas con vainillina. C. Placa eluida con AcOEt sin revelar y en la cual se recuperaron los compuestos divididos en 16 regiones (números rojos) usando como base la placa B.

Cabe señalar que con esta metodología en la que se recuperan los compuestos directamente de la placa, se analizan principalmente los mayoritarios o los más activos y cabe la posibilidad de que existan otros que por estar en una concentración menor, no se hayan aislado en cantidades apropiadas. Así también, no es recomendable para analizar compuestos termolábiles como se demostró en un

trabajo previo con la amoxicilina, la cual pierde por completo la actividad al ser sometida a este proceso<sup>165</sup>.

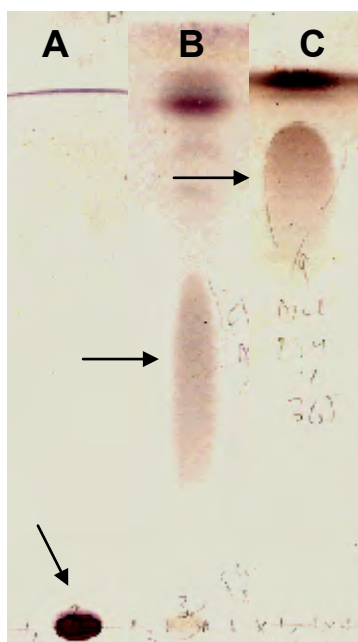


**Figura 15.** Actividad anti-*H. pylori* de las 16 regiones obtenidas de la placa sin revelar de la figura 14C. Para éste experimento se utilizó la cepa *H. pylori* ATCC 8823.

A partir de un extracto de éter de petróleo y mediante cromatografía en columna (columna 2) se obtuvieron 40 mg de una fracción (F-II:C2) que contenía el compuesto *región 7* parcialmente puro (figura 16). Para comprobar que la actividad se debe únicamente al compuesto *región 7* y no a los componentes minoritarios, una porción se purificó por CCFP y se determinó la actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori* en CL. Únicamente fueron activas la F-II:C2 completa y el compuesto *región 7* puro. Posteriormente, 10 mg de la F-II:C2 se metilaron para volatilizar la muestra en el cromatógrafo de gases y realizar el análisis de masas.

En cuanto a la actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori* de *A. adstringens* como se indicó anteriormente no se había investigado, sin embargo, los ácidos anacárdicos aislados del fruto y del aquenio de un árbol originario del Brasil llamado *A. occidentale* (“marañón o nuez de la india”) inhiben el crecimiento de la bacteria<sup>96</sup>. Con este antecedente, se infirió que los compuestos de la

*región 7* podrían ser ácidos anacárdicos, por lo cual se realizó una colaboración con el grupo la Dra. Rachel Mata de la Facultad de Química de la UNAM, quienes identificaron por primera vez este tipo de compuestos en la corteza de *A. adstringens*<sup>124</sup>.



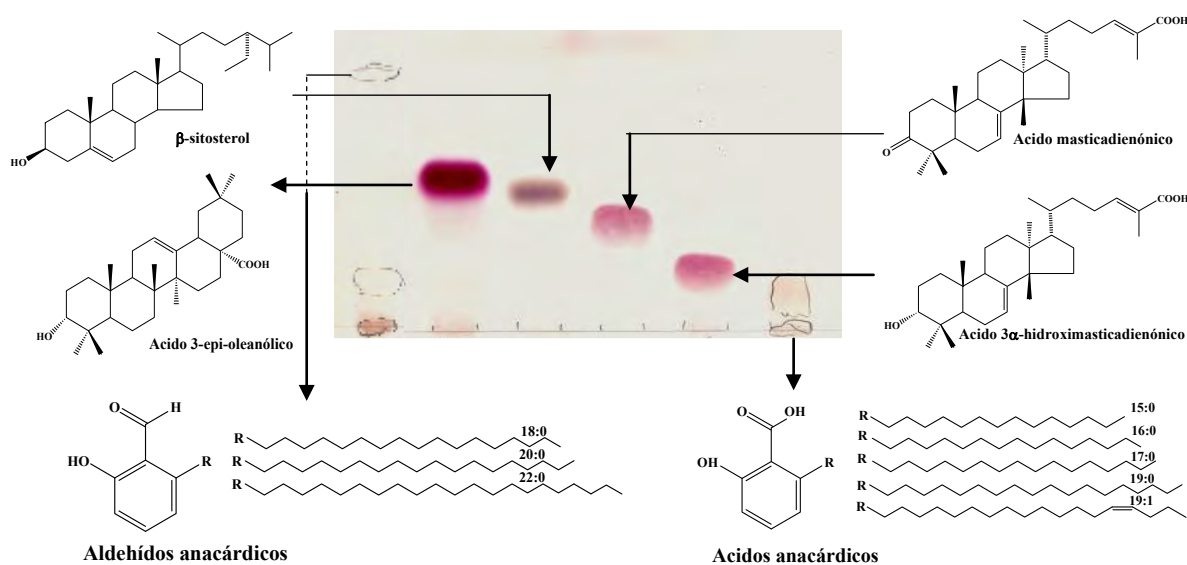
**Figura 16.** Placas de CCF revelada con vainillina de la fracción F-II:C2 que muestra a los compuestos *región 7* (flechas) en varios sistemas de elución con hexano/AcOEt. A 9:1, B 7:3 y C 1:9.

La comparación en CCF de los compuestos *región 7* con una muestra de ácidos anacárdicos de referencia (mAAref), así como el análisis de espectrometría de masas, confirmaron que se trataba de una mezcla de ácidos anacárdicos. El análisis de CG/EM de la fracción F-II:C2 (referida de aquí en adelante como mezcla de ácidos anacárdicos I (mAA-I), indicó que estaba constituido por cinco ácidos anacárdicos, cuatro con cadenas saturadas de C<sub>15:0</sub> (46.8 %), C<sub>16:0</sub> (7.2 %), C<sub>17:0</sub> (29.9 %), C<sub>19:0</sub> (7.5 %) y uno con una monoinsaturada de C<sub>19:1</sub> (8.6 %), proporciones similares con la de referencia previamente reportada (tabla 7). Cabe señalar que el análisis químico fue hecho por el Dr. José Fausto Rivero Cruz del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM.

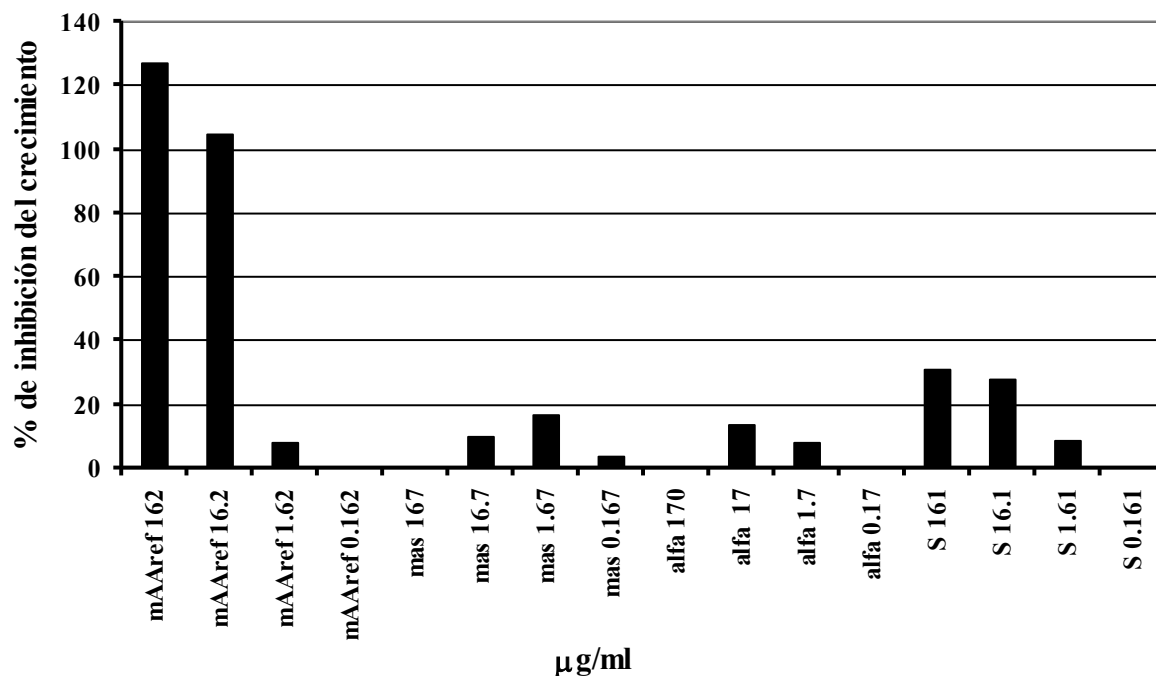
#### 4.3. Actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori* de compuestos de referencia de *A. adstringens*.

Con el objetivo de establecer la actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori* de otros compuestos presentes en la corteza, se evaluaron muestras de referencia (ácidos masticadienónico, 3- $\alpha$ hidroximasticadienónico, 3-epioleanólico y mAAref, así como el  $\beta$ -sitosterol y los aldehídos anacárdicos (mAL)) comparándolos con la actividad de dos antibióticos comerciales, la amoxicilina y el metronidazol, utilizando el método de CL (figura 17).

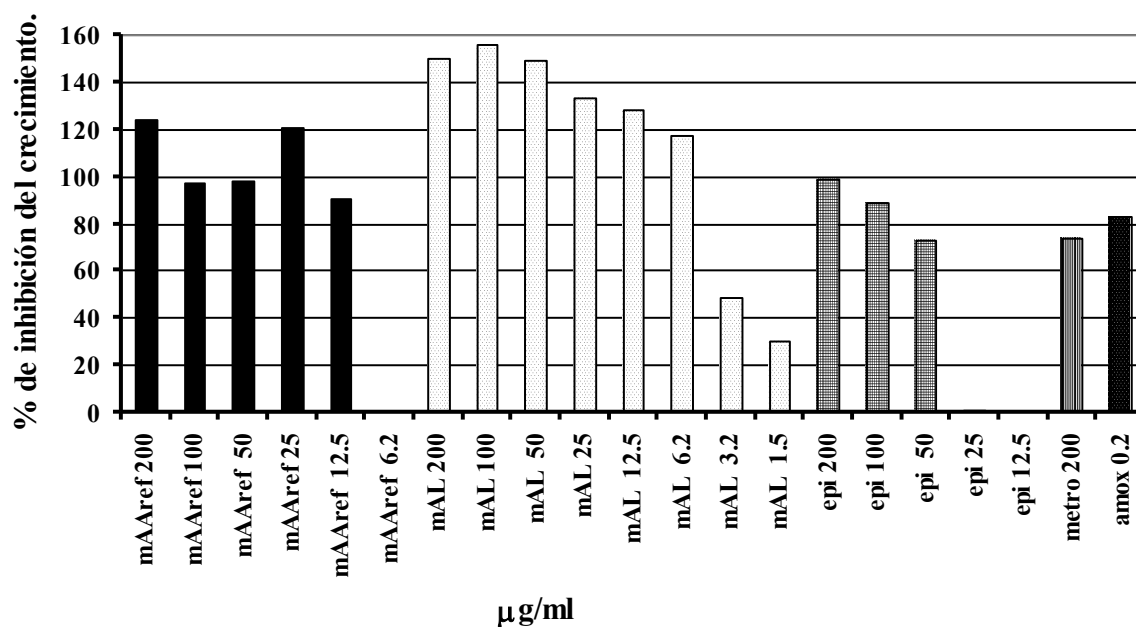
El  $\beta$ -sitosterol, los ácidos 3-epioleanólico, 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico y el masticadienónico, se han descrito como los responsables de la actividad gastroprotectora (en un modelo de ulceración con métodos químicos) y para los dos últimos también de la antiinflamatoria<sup>8,13,140,141,142,152,158</sup>. El único que mostró una actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori* fue el ácido 3-epioleanólico con una CMI de 200  $\mu$ g/ml (figuras 18 y 19). Este tipo de compuestos que presentan una actividad contra la bacteria, complementado con un “efecto gastroprotector”, los hemos denominado compuestos duales y son muy importantes, ya que uno de los principales problemas que se tienen con las terapias de erradicación de *H. pylori*, es que entre más agentes se incluyan, más efectos secundarios, razón por la cual este tipo de compuestos pueden ayudar a reducirlos, ya que se requiere de un solo medicamento capaz de actuar a varios niveles. Por otra parte, el ácido 3-epioleanólico, se identificó por CCF en la fracción rica en terpenos (*región 2*), por lo que la actividad de la fracción completa, puede deberse principalmente, o en parte a este compuesto (figura 16).



**Figura 17.** Cromatoplaqa revelada con vainillina de las muestras de referencia aisladas de la corteza de *A. adstringens*. La mezcla de ácidos anacárdicos vira ligeramente a un color café, no obstante la de aldehídos no revela y solo se puede ver mediante luz UV. Eluida con hexano/AcOEt 8:2.



**Figura 18.** Actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori* de los compuestos de referencia de la corteza de *A. adstringens*. mAAref: mezcla de ácidos anacárdicos de referencia. mas: ácido masticadienónico. alfa: ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico. S:  $\beta$ -sitosterol. La cepa de *H. pylori* utilizada en este ensayo fue la ATCC 43504.



**Figura 19.** Comparación de la actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori* de tres compuestos provenientes de la corteza de *A. adstringens*. mAAref: mezcla de ácidos anacárdicos de referencia. mAL: mezcla de aldehídos anacárdicos. epi: ácido 3-epioleanólico. Antibióticos de referencia, metro: metronidazol y amox: amoxicilina.

La mAAref mostró una CMI de 10 µg/ml la cual es relevante al compararse con los antibióticos metronidazol, que con 300 µg/ml logró una inhibición del 89.9 % y amoxicilina con 0.1 µg/ml el 90 % (tabla 6). Hace unos meses Morais y colaboradores (2010) reportaron que la mezcla de ácidos anacárdicos obtenidos del *A. occidentale* también presenta un fuerte efecto gastroprotector en ratones con daño inducido por etanol, por lo cual, este tipo de compuestos puede considerarse también como dual<sup>134</sup>.

Otros compuestos que también resultaron activos fueron los de la mAL, con una CMI de 6.25 µg/ml (figura 19). Para este experimento la mAAref se presentó entre 12.5 y 25 µg/ml, no obstante, es



relevante destacar que la mAL mostró el mayor efecto de los tres compuestos activos, ya que sigue inhibiendo el 48 % con 3.25 µg/ml y el 30 % con 1.56 µg/ml (figura 19).

**Tabla 6.** Efectividad de la mezcla de ácidos anacárdicos del *A. adstringens* con respecto a antibióticos comerciales.

Compuesto µg/ml	% de inhibición
mAAref 16	*112.3
mAAref 10	109
mAAref 2	48.33
Metronidazol 300	89.8
Amoxicilina 0.1	90.4

La cepa de *H. pylori* utilizada fue la ATCC 43504. \* La inhibición mayor al 100 % es debida a un proceso de lisis de la bacteria por parte del compuesto.

En cuanto a la actividad registrada para las dos mezclas de ácidos anacárdicos del *A. adstringens* (mAAref y la mAA-I) no se encontraron diferencias importantes en su actividad, ya que ambas presentan CMI que van de 10 a 20 µg/ml y cabe señalar que las proporciones de los distintos ácidos anacárdicos en ambas mezclas es casi idéntica. Esta situación es diferente cuando se comparan con los ácidos anacárdicos del *A. occidentale* previamente reportados<sup>96</sup> (tabla 7).

La principal diferencia radica en el tipo de ácidos anacárdicos que contienen estas plantas, para el caso del *A. adstringens* son mayoritariamente de cadenas saturadas y presenta un grupo de cadenas de más de 15 átomos de carbono. Para el caso del *A. occidentale*, las cadenas están restringidas a 15 átomos de carbono y son mayoritariamente insaturadas. Kubo en 1996 determinó la actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori* de los ácidos anacárdicos de *A. occidentale*, concluyendo que el C<sub>15:0</sub> es inactivo, que la eficiencia aumenta entre más insaturaciones presente y que cadenas más largas de 15 átomos disminuyen la actividad<sup>96</sup>. La CMI encontrada (200 a 400 µg/ml) para sus ácidos

anacárdicos más activos es de 100 a 200 veces menor que la obtenida con sus antibióticos de referencia. La CMB del compuesto más activo el C<sub>15:3</sub>, fue de 800 µg/ml, la cual no es significativa.

La mAAref y la mAA-I evaluada contra *H. pylori* contiene de 48 al 50 % del C<sub>15:0</sub> y el resto son principalmente anacárdicos saturados y de cadenas mayores de 15 átomos de carbono, características que de acuerdo a los resultados de Kubo, deberían de ser inactivos. Nuestros experimentos indican que son activos con una CMI de 10 µg/ml y una CMB de 16 µg/ml. Estos resultados sugieren que los ácidos anacárdicos del *A. adstringens* son más efectivos que los del *A. occidentale* y que posiblemente la actividad se debió únicamente a los anacárdicos de cadenas mayores de 15 átomos de carbono que corresponden al otro 50 % de la mezcla.

**Tabla 7.** Fenoles de cadena larga del *A. occidentale* y de *A. adstringens*.

Fenoles de cadena larga	<i>Anacardium occidentale</i> “marañón”	<i>Amphipterygium adstringens</i> “cuachalalate”
<b>Ácidos anacárdicos</b>	C <sub>15:0</sub> (trazas) [ $> 800$ ] C <sub>15:1</sub> (16.95%) [400] C <sub>15:2</sub> (16.33%) [200] C <sub>15:3</sub> (62.83%) [200]{800}	C <sub>15:0</sub> (50%)* (46.8%) C <sub>16:0</sub> (6.4%)* (7.2%) C <sub>17:0</sub> (28.8)* (29.9%) [10]{16} C <sub>19:0</sub> (8.5%)* (7.5%) C <sub>19:1</sub> (6.4%)* (8.6%)
<b>Cardanoles</b>	C <sub>15:0</sub> (trazas) C <sub>15:1</sub> (15.32%) C <sub>15:2</sub> (16.57%) C <sub>15:3</sub> (61.45%)	
<b>Cardoles</b>	C <sub>15:0</sub> (trazas) C <sub>15:1</sub> (1.37%) C <sub>15:2</sub> (13.53%) C <sub>15:3</sub> (84.55%)	
<b>Aldehídos anacárdicos</b>		C <sub>18:0</sub> (50%) C <sub>20:0</sub> (35%) C <sub>22:0</sub> (15%)

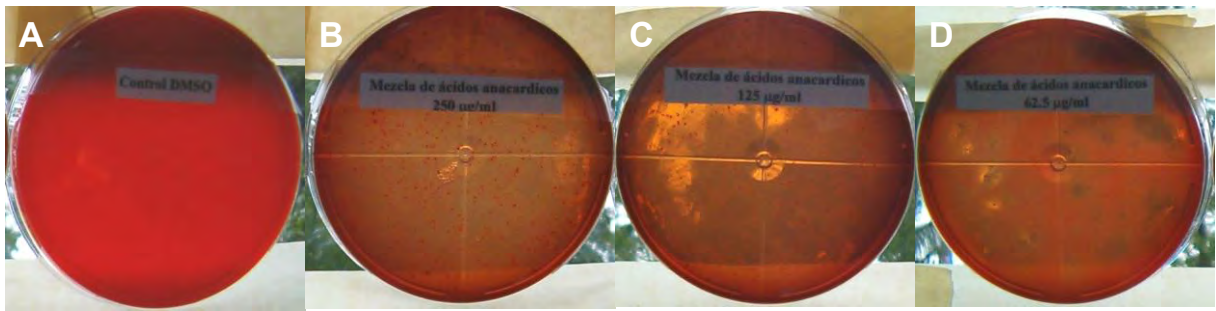
Entre paréntesis se señala el contenido en porcentaje del fenol de cadena larga determinado en el aceite de la cáscara de la nuez (“cashew nut-shell liquid”) del *A. occidentale* por HPLC<sup>159</sup> y de la corteza de *A. adstringens* por CG/EM. Con un asterisco mAAref<sup>124</sup> y mAA-I<sup>38</sup>. La actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori* solo ha sido determinada para los ácidos anacárdicos del *A. occidentale*<sup>96</sup> y para la mAA del *A. adstringens*<sup>38</sup>. [ ]: CMI µg/ml y { } : CMB µg/ml.

#### **4.4. Actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori* de los ácidos anacárdicos y extractos mediante el método de DA.**

Una diferencia importante entre los dos estudios es el bioensayo que se utilizó para determinar la actividad, para el caso del *A. occidentale* se realizó en DA (placas multipozos) y para el *A. adstringens* se utilizó el CL. Para esclarecer si la actividad de la mAA del *A. adstringens* era más efectiva que la del *A. occidentale*, se determinó su efecto utilizando el método de DA y siguiendo las recomendaciones de la CLSI/NCCLS con la cepa de colección ATCC 43504, así como con seis aislamientos gástricos de pacientes mexicanos.

Bajo este método, la mAAref fue inactiva a la máxima concentración de prueba (CMI >250 µg/ml) (tabla 8). Al observar las cajas de agar, se aprecia la mAAref completamente precipitada (figura 20), por lo cual concluimos que el método de DA no es adecuado para determinar la actividad de compuestos poco polares, como son los ácidos anacárdicos y que las diferencias encontradas con el trabajo de Kubo en 1996, son debidas básicamente a este punto y no a las diferencias en la estructura química de los compuestos. Para corroborar que el cultivo líquido es un buen método para estudiar la actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori* de los ácidos anacárdicos, se probó el efecto del ácido anacárdico 15:0 (Calbiochem) el cual resultó activo con una CMI de 5 µg/ml.

Estos resultados indican que no se ha explorado totalmente el potencial de los ácidos anacárdicos contra la bacteria y aún faltan estudios para concluir que parte de su estructura es determinante para la actividad. Por otro lado, se han reportado otros fenoles de cadena larga aislados de estas plantas a los cuales no se les ha determinado su efectividad como son los cardoles, cardanoles, así como derivados metilados entre otros.



**Figura 20.** Baja solubilidad de la mAAREf en las placas de agar MH-s. A: control con DMSO. mAAREf a 250 µg/ml (B), 125 µg/ml (C) y 62.5 µg/ml (D).

También, se determinó la actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori* del extracto de éter de petróleo en DA, en este caso los medios también presentaron un aspecto grumoso, aunque los precipitados eran menos evidentes. El extracto resultó activo con todas las cepas probadas, pero con diversos grados de inhibición y nunca se logró una actividad como la que presenta el extracto en CL (tabla 8 y figura 13). Un dato interesante es que las cepas LA-M1, LA-M4 y LA-M6 se inhiben en presencia del extracto de éter de petróleo, no así por la mAAREf, indicando que existen otros compuestos activos más solubles en el medio. Tabla 8.

**Tabla 8.** Actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori* de extractos y mAAREf con una cepa de colección y seis aislamientos gástricos.

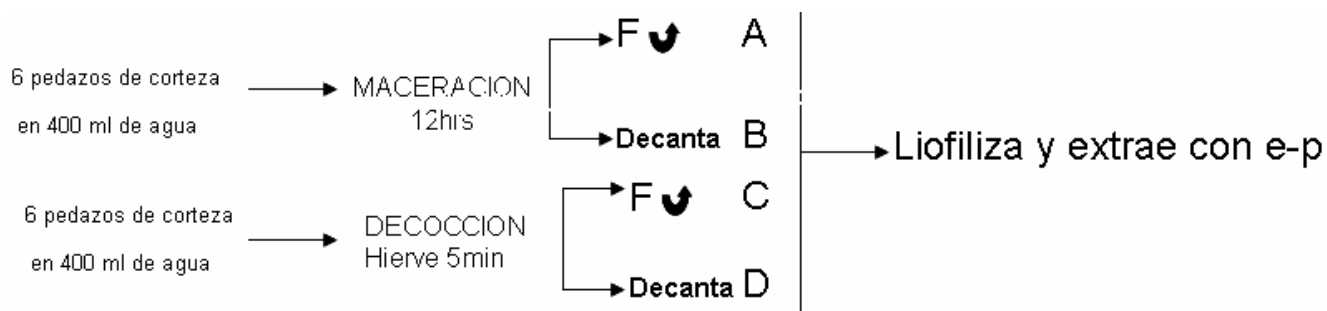
	CEPA DE <i>H. pylori</i> CMI µg/ml						
	43504	LA-M1	LA-M2	LA-M3	LA-M4	LA-M6	LA-MA2
<b>Extracto acuoso</b>	500	500	250	<125	250	250	500
<b>Extracto con éter de petróleo</b>	500	125	500	500	250	125	500
<b>Mezcla de ácidos anacárdicos</b>	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
<b>Metronidazol</b>	75	35.3	<8.8	75	<8.8	35.5	75
<b>Amoxicilina</b>	0.05	0.025	0.025	0.025	0.025	0.05	0.1

Aunque la actividad mostrada por el extracto acuoso en CL no siempre es repetitiva a lo largo de varios experimentos, en DA presenta una CMI clara, además de que con este método se pudo determinar la actividad a una concentración máxima de 1000 µg/ml. Al igual que el extracto de éter de petróleo, el acuoso también muestra distintos grados de actividad dependiendo de la cepa bacteriana, la cual se registró en un intervalo de <125 a 500 µg/ml (tabla 8). De manera general, los aislamientos resultan ser más sensibles que la cepa de colección tanto a los extractos como a los antibióticos de referencia, esto último a pesar de que son cepas identificadas como resistentes al metronidazol, a excepción de la última que también lo es a la amoxicilina (tabla 8). Por otra parte la actividad mostrada por ambos extractos es mucho menor a la presentada por los antibióticos de referencia, por lo que es necesario analizar si dicho efecto puede considerarse relevante mediante los estudios *in vivo*.

#### **4.5. Presencia de compuestos activos en extractos acuosos de la corteza de *A. adstringens*.**

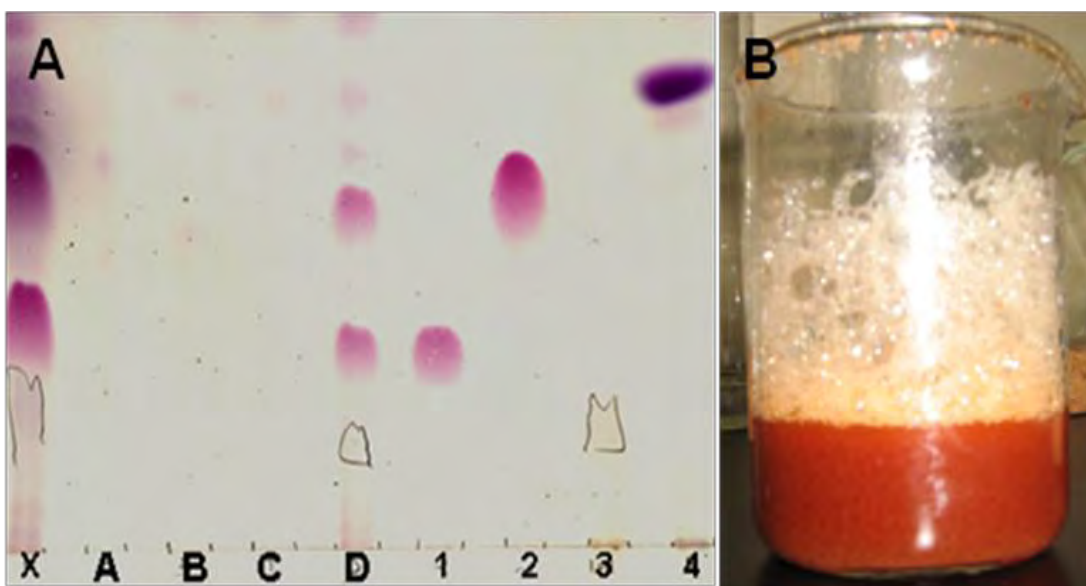
La actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori* de los compuestos presentes en la corteza de *A. adstringens* complementan los estudios previos de la planta y con los cuales se busca justificar el uso tradicional que se le da. Bajo este contexto, es importante señalar que en el presente trabajo también se seleccionó a la especie objeto de estudio con base en el criterio etnobotánico. Los biensayos preliminares se realizaron a partir de extractos acuosos que es lo que emplea la gente para el tratamiento de la gastritis y la úlcera péptica, por lo cual, es importante cerciorarse que los compuestos activos se encuentren en dichos preparados. Para responder a esto, se realizaron una serie de experimentos en los cuales se encontró que tanto la mezcla de ácidos anacárdicos, como los terpenos, solo se extraen con solventes de polaridades menores al etanol y en ninguno de los extractos acuosos analizados por CCF se lograron identificar (datos no mostrados).

La principal forma tradicional de uso de la corteza de *A. adstringens* para el tratamiento de gastritis y/o úlcera es por decocción o maceración en agua, por esta razón se diseñó un experimento en el que se reprodujeron las condiciones utilizadas por los dos métodos tradicionales (figuras 21B y D), incluyendo también la metodología empleada en este trabajo (figuras 21 A y C).



**Figura 21.** Dos formas de preparación tradicional de la corteza de *A. adstringens* para el tratamiento de la gastritis y la úlcera. Se utilizan pedazos de corteza que se extraen por maceración y decocción en agua. En ambos casos, la mitad se centrifuga y se hace pasar por un papel filtro # 1 y la otra mitad solo se decanta. El material obtenido se liofiliza y se extrae posteriormente con éter de petróleo y se identifican los compuestos por CCF.

Los terpenos así como la mezcla de ácidos anacárdicos se presentan únicamente bajo las condiciones de decocción de la corteza entera en agua, sin centrifugar ni filtrar (figura 22 carril D). La decocción en agua facilitó que se desprendieran pequeñas porciones de la corteza y al no filtrarla ni centrifugarla se pudo extraer los compuestos activos con el éter de petróleo, a partir del liofilizado. A simple vista este resultado es lógico y de alguna manera obvio, ya que la gente no filtra ni centrifuga, sin embargo en ninguna condición se pudo determinar el rendimiento de las extracciones con éter de petróleo, ya que la cantidad era escasa. Aunque no se hizo un análisis cuantitativo, parece difícil que se logren alcanzar las dosis necesarias para el efecto gastroprotector/antiinflamatorio y aún más para que logren erradicar a *H. pylori* dentro del estómago humano.



**Figura 22. A:** Cromatoplaaca de los extractos de éter de petróleo del experimento de la figura 21. Eluida con hexano/AcOEt 7:3 y revelada con vainillina. X = Control: corteza extraída con éter de petróleo. **Maceración:** A = centrifugado y filtrado. B = Decantado. **Decocción:** C = centrifugado y filtrado. D = Decantado. Compuestos de referencia, 1: ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico, 2: ácido masticadienónico, 3: mezcla de ácidos anacárdicos y 4:  $\beta$ -sitosterol. **B:** Presencia de saponinas en el extracto acuoso las cuales se infiere por la formación de espuma al agitarse.

Otra posibilidad para poder ingerir dichos metabolitos es por medio del uso de tinturas extraídas con alcohol, las cuales son incorporadas al agua pero esto no es muy utilizado para la corteza de *A. adstringens*. De tal manera que tienen que hacerse más estudios y determinar si la concentración de estos compuestos en el extracto es significativa para afectar la viabilidad de *H. pylori* o mostrar un efecto gastroprotector y/o antiinflamatorio. Con base en todas las observaciones realizadas es posible inferir que es poco probable que los compuestos activos descritos hasta este momento en la literatura para la corteza, los esté ingiriendo la gente por vía oral.

Por otra parte, es interesante señalar que el extracto acuoso de la corteza centrifugado y filtrado, en el cual no hay ninguno de los compuestos activos antes mencionados, muestra una actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori* con un CMI de <125 a 500  $\mu$ g/ml en DA (tabla 8). González y Delgado en 1962 reportaron que el mayor componente presente en el extracto acuoso son

las saponinas de tipo esteroideal (figura 22B)<sup>67</sup>. De Leo y colaboradores en 2006 encontraron una serie de saponinas triterpénicas con actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori* aisladas de la corteza de *Pteleopsis suberosa*, por lo cual es posible que la actividad encontrada en el extracto acuoso se deba a este tipo de compuestos<sup>48</sup>. Es importante realizar más estudios al extracto acuoso, ya que los compuestos con actividad biológica reportados hasta el momento (algunos de ellos se están incluyendo como controles de calidad en la Farmacopea Mexicana) no están presentes en el mismo<sup>45,139</sup>.

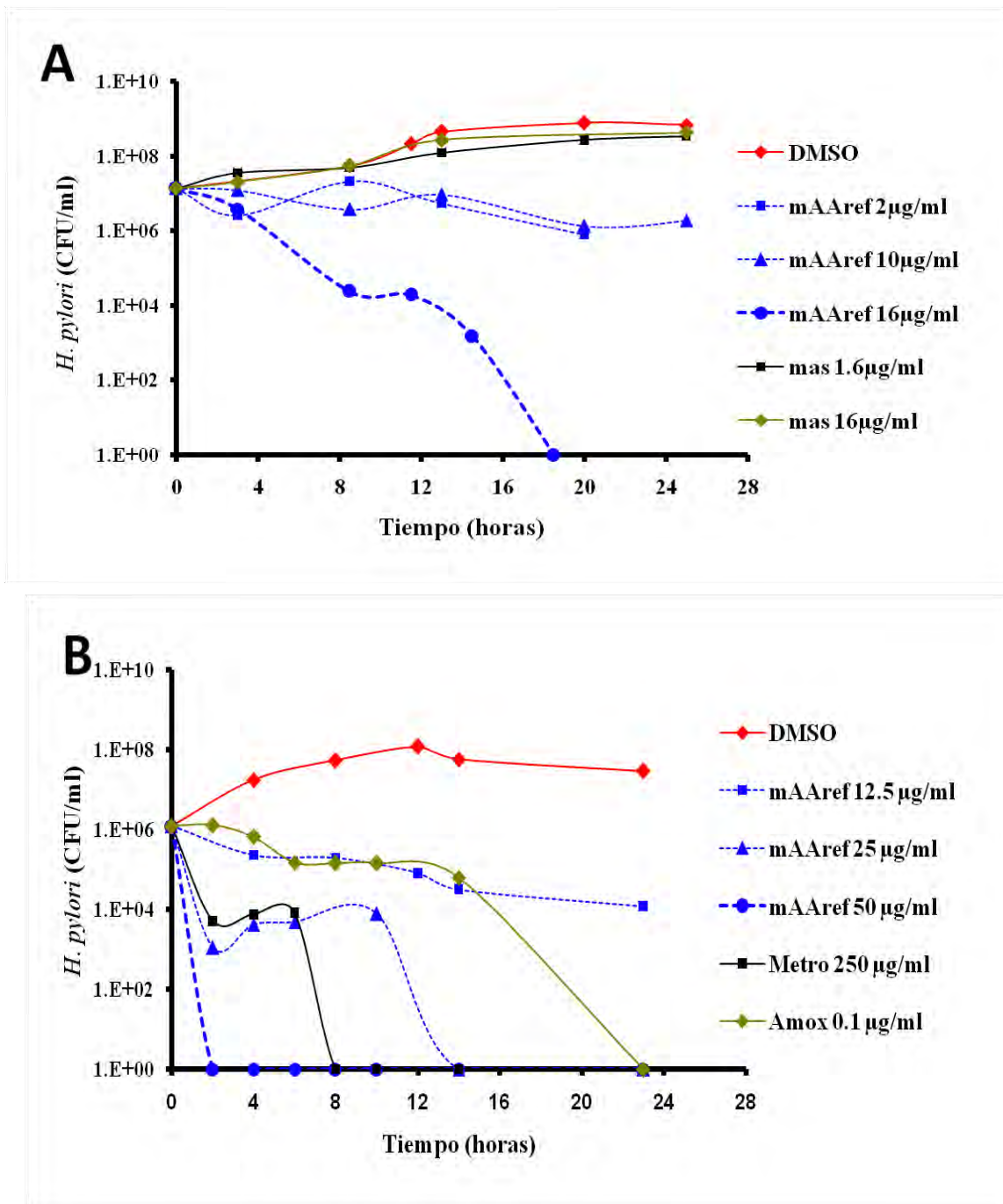
#### **4.6. Actividad bactericida de la mezcla de ácidos anacárdicos.**

Para el cálculo de la concentración mínima bactericida (CMB) se realizó cuenta viable de cultivos líquidos, con diferentes tiempos y concentraciones de la mAAREf. Bajo esta metodología el valor de la CMB es de 16 µg/ml y se logra la máxima actividad a un tiempo aproximado de 18 h, así también, no se registró un efecto del ácido masticadienónico usado como control negativo (figura 23A). Con una concentración de 25 µg/ml el efecto bactericida se logra a un tiempo de 15 h y con 50 µg/ml se observó a la primera medición realizada, que fue de 3 h (figura 23B).

A concentraciones menores de 12.5 µg/ml (2 y 10 µg/ml) se observa un claro efecto de tipo bacteriostático ya que el número de bacterias se mantiene relativamente constante al menos hasta 23 h que fue el tiempo de la última medición y en el que se registro aún bacterias viables (figura 23 A y B).

Por otra parte la CMB registrada para la amoxicilina fue de 0.1 µg/ml en un tiempo de 23 h y para el metronidazol de 250 µg/ml en 8 h (figura 23B).





**Figura 23.** Cinéticas del efecto bactericida de la mAAref del *A. adstringens*, masticadienónico y los antibióticos de referencia metronidazol y amoxicilina. mAAref = mezcla de ácidos anacárdicos de referencia. El tiempo 0 equivale al inicio de la fase logarítmica del cultivo. Las gráficas corresponden a dos experimentos realizados por separado.

#### **4.7. Actividad bacteriolítica de la mezcla de ácidos anacárdicos.**

Para el caso de las dos mezclas de ácidos anacárdicos (mAAref y mAA-I) al realizar los bioensayos en cultivos líquidos se observó un posible proceso de lisis bacteriana, ya que al final del tiempo de incubación y a concentraciones altas, la absorbencia era mucho menor de la que presentaba el cultivo inicial y la cual se veía reflejada en el registro de actividades inhibitorias mayores del 100 %. De tal manera que se analizaron los cambios morfológicos que experimentaban las bacterias a diferentes concentraciones de la mAAref, mediante microscopia electrónica de transmisión.

Las bacterias tratadas con DMSO (control) y con 12.5  $\mu\text{g/ml}$  de la mAAref, no mostraron un cambio en la morfología monitoreado hasta un tiempo máximo de incubación de 18 h. En las preparaciones se observaron bacilos curvos de diferente tamaño, con una estructura íntegra (figura 24 A, B y C, D), así como en algunos campos se logró observar algunas estructuras esféricas, que se pueden apreciar con mayor claridad en las figuras 24 A y D.

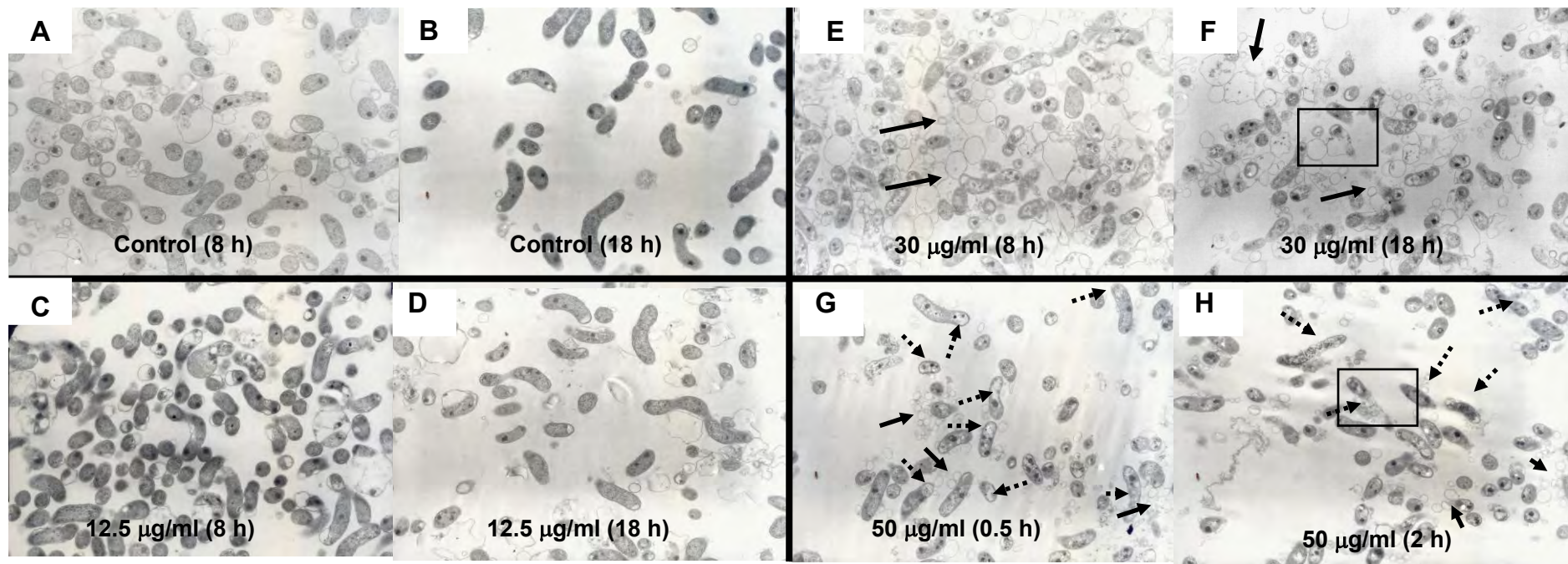
Para el caso de las bacterias tratadas con una concentración de 30  $\mu\text{g/ml}$  de la mAAref a los mismos tiempos de incubación (8 y 18 h) se aprecia en las micrografías que los bacilos pierden su estructura, haciéndose cortos y redondeados, también, se observan las mismas estructuras esféricas que en las dos condiciones anteriores, en mayor proporción y diversidad de tamaños (flechas en figura 24 E y F).

El cultivo tratado con 50  $\mu\text{g/ml}$  de la mAAref, se monitoreó a un tiempo máximo de 2 h. En un tiempo de 30 minutos de incubación se pueden apreciar bacilos cortos y curvos, los cuales presentan áreas en las que se ha perdido el citoplasma (flechas punteadas figura 24 G), así como también, se logra apreciar la aparición de algunas figuras esféricas mucho más pequeñas (flechas figura 24 G). En un tiempo de 2 h la morfología de los bacilos es menos clara y se logra apreciar varios de ellos en proceso de lisis (flechas punteadas figura 24 H y aumento de la 25 C), no obstante las estructuras

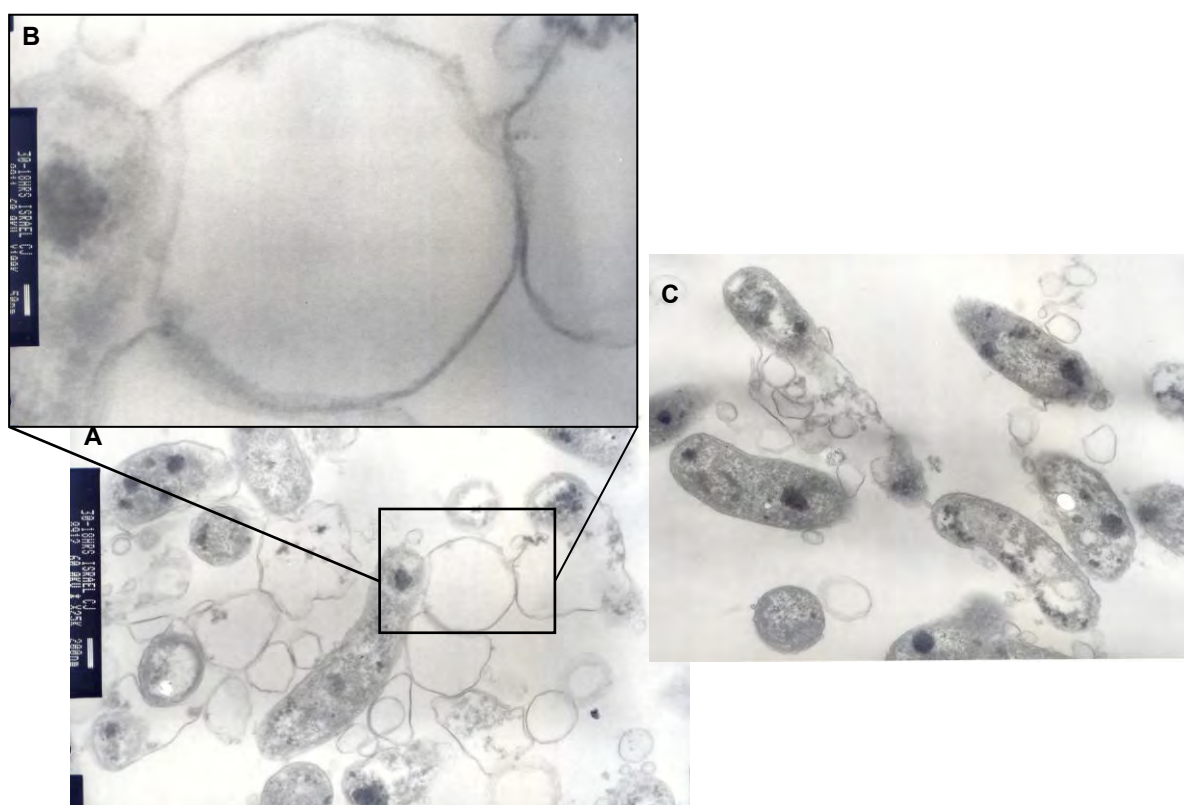
esféricas se mantienen en una proporción baja (flechas figura 24 H). Al examinarse con un mayor aumento las estructuras esféricas, se observó que correspondían a membranas vacías, donde inclusive se pudo observar la bicapa lipídica (figura 25 A y B).

Si se comparan las curvas para el cálculo de la CMB (figura 23) y la morfología de la bacteria (figuras 24 y 25), se pueden identificar la existencia de dos efectos, uno bacteriostático que se presenta cuando se somete a concentraciones menores de 12.5  $\mu\text{g/ml}$ , en el cual la morfología de la bacteria no se altera, pero sí se ve atenuado su crecimiento y otro bacteriolítico, que se da a concentraciones mayores de 30  $\mu\text{g/ml}$ , en el que la bacteria sufre un proceso de lisis. Este efecto se observa en los cultivos tratados con esta última concentración, los cuales presentan una gran cantidad de estructuras esféricas de diversos tamaños (flechas en figura 24 E y F). Cabe señalar que en algunos campos de las micrografías de controles tratados únicamente con DMSO y con 12.5  $\mu\text{g/ml}$  de la mezcla, se observaron algunas estructuras líticas, las cuales pueden atribuirse a la lisis “natural” debida a la agitación y manejo de los cultivos. Por otra parte, la proporción de estas estructuras fue menos evidente a una concentración de la mezcla de 50  $\mu\text{g/ml}$ , pero se observan los campos con menor número de bacterias y es común la presencia de bacilos, captados en pleno proceso lítico, lo que nos habla claramente de un efecto directo sobre la pared celular y/o la membrana bacteriana, a concentraciones altas de la mezcla.

De tal manera que se pueden sugerir dos posibles mecanismos de acción, el primero relacionado con el efecto bacteriostático, en el cual la molécula de ácido anacárdico entra a la célula bacteriana, e interfiere con varias rutas metabólicas que retrasan la duplicación. Para el caso del efecto bactericida de tipo bacteriolítico, los resultados sugieren un mecanismo de acción que afecta la membrana o la pared celular directamente. Por otra parte, al tratarse de una mezcla, puede ser que cada uno de estos efectos sea atribuido a compuesto en particular, por lo que resulta importante analizar el efecto de cada uno de manera individual.



**Figura 24. Micrografías electrónicas de transmisión.** Efecto de tres concentraciones de mAAref en la morfología de *H. pylori*. Aumento 8000 x. Flechas en E y F, señalan estructuras esféricas. Flechas en G y H señalan figuras esféricas de menor tamaño que en E y F, así como las flechas punteadas a bacilos cortos y curvos, los cuales presentan áreas en las que se ha perdido el citoplasma. Estas micrografías son tomadas de un experimento posterior al de la figura 23, es por eso que la concentración de 25 µg/ml no aparece.



**Figura 25.** Micrografías electrónicas de transmisión. A: aumento de 25,000x de la preparación original, ubicando la zona marcada en recuadro de la figura 24 F. B: Aumento de 100,000x de la preparación original, ubicando el recuadro A. C: Muestra un bacilo en proceso de lisis a un aumento de 25,000x de la preparación original, ubicando del recuadro de la figura 24 H.

#### **4.8. Citotoxicidad de los ácidos anacárdicos y toxicidad aguda de extractos.**

Es importante que la actividad de los compuestos activos, incluyendo la actividad bactericida de la mAA sea lo más específica posible sobre la bacteria y que no afecte la viabilidad de las células humanas. Para el caso de la mAA del *A. adstringens*, Acevedo y colaboradores (2006) reportaron que el 6-nonadecil ácido salicílico (C<sub>19:0</sub>), uno de los ácidos anacárdicos menos abundantes de la mezcla (8 %) presenta un efecto citotóxico, determinado por el ensayo de micronúcleos en eritrocitos policromáticos de sangre periférica de ratón<sup>3</sup>.

En este trabajo se evaluó la toxicidad de la mAAref utilizando el método colorimétrico de MTT el cual se fundamenta en la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 difeniltetrazolio a formazan púrpura mediado por las deshidrogenasas mitocondriales de células viables. Dicha actividad se determinó en células mononucleares de sangre periférica humana, a concentraciones de 0.01 a 50 µg/ml, en las cuales no se afecta la viabilidad en los tiempos de 3 y 24 h, aunque se presentó un ligero efecto no dosis dependiente a las 48 h (tabla 9).

Así también, los extractos acuosos y hexánicos de la corteza de *A. adstringens* no mostraron una toxicidad aguda bajo el método de Lorke, registrando una LD<sub>50</sub> de >5,000 mg/K. Para el caso del extracto metanólico no se determinó, ya que no se pudo solubilizar en ninguno de los vehículos probados. Estos datos están acordes con estudios recientes sobre la determinación de parámetros de seguridad de plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana, en las que se clasifica a *A. adstringens* como una planta no tóxica<sup>45,51,139</sup>.

**Tabla 9.** Viabilidad de linfocitos tratados por 48 h con mAAref.

[mAAref] final µg/ml	% de viabilidad
0	100
0.01	92.9
0.05	92.5
0.1	87.4*
0.5	90.2*
1.0	93.7
5.0	87.0*
10.0	91.7*
50.0	92.2*

*t* de Students. \**P* < 0.05.

#### 4.9. Relación estructura actividad de fenoles de cadena larga.

Como se mencionó, aún no se ha estudiado claramente la relación de la estructura de los ácidos anacárdicos (al igual que de otros fenoles de cadena larga) con la actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori*. Para el caso de la corteza de *A. adstringens* se han descrito además una mezcla de aldehídos anacárdicos (mAL) (figura 17 y tabla 7), los cuales no se encontraron en el presente proyecto posiblemente porque la concentración de estos en la corteza es relativamente baja (0.0023 %) <sup>124</sup>. El grupo de la Dra. Rachel Mata nos proporcionó una muestra de esta mezcla, que a pesar de estar parcialmente pura, mostró ser ligeramente más efectiva que la mAA ya que presentó una CMI de 6.25 µg/ml, además de que es capaz de inhibir el 30 % del crecimiento a la concentración de 1.56 µg/ml (figura 19). Aunque estamos conscientes de que se trata de mezclas, es interesante ver que la de aldehídos son cadenas también saturadas ligeramente mayores (C<sub>18:0</sub>, C<sub>20:0</sub> y C<sub>22:0</sub>) que la mAA. Este aumento en actividad tiene que ser corroborado con una muestra pura, sin embargo estos resultados nos indican que es importante el grupo funcional que se encuentre en el anillo y que en este caso un grupo aldehído en lugar de un carboxilo es capaz de potenciar la actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori*.

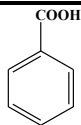
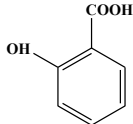
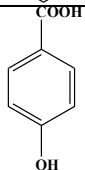
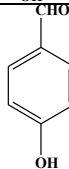
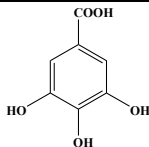
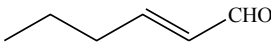
Para poder inferir una relación de estructura actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori* de los ácidos anacárdicos, se determinó en CL la CMI de cinco anillos que varían en los sustituyentes (posición y número de OH, presencia de grupos COOH ó COH) y de cuatro cadenas que varían en tamaño y presencia de insaturaciones, así como de algunos compuestos relacionados (tabla 10).

De acuerdo a la CMI obtenida, se puede inferir que la actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori* de los ácidos anacárdicos, depende de la presencia de la cadena, ya que los anillos, ácido benzoico, ácido salicílico, ácido parahidroxibenzoico, aldehído parahidroxibenzoico, ácido gálico y vainillina, muestran CMI mayores de 200 µg/ml. Así también, no hay una relación entre el número

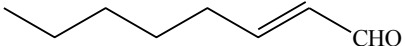
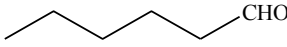
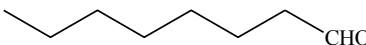
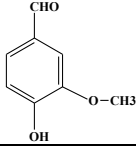
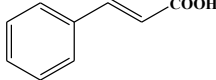
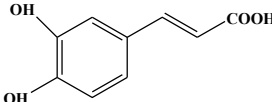
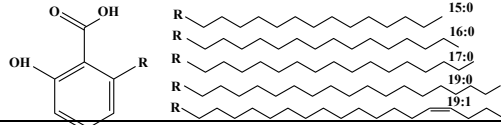
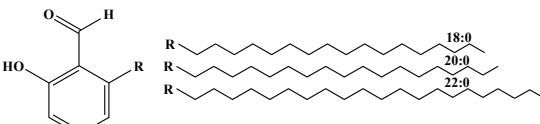
de grupos OH, la posición de los mismos, o por la presencia de un grupo carboxilo o aldehído con la actividad, al menos en los anillos solos.

Todas las cadenas probadas (trans-2-hexenal; trans-2-octenal, hexanal y octanal) son activas, con CMI menor o igual a 100  $\mu\text{g/ml}$ . Para el caso de las cadenas saturadas fue dieciséis veces más activa una cadena de  $\text{C}_6$  en comparación con la de  $\text{C}_8$ , no así para sus respectivas monoinsaturadas en las que la actividad fue la misma, registrando una de CMI de 50  $\mu\text{g/ml}$ . Para el caso particular del hexanal la actividad se ve disminuida ocho veces cuando se presenta la insaturación. Caso contrario con el octanal que en presencia de una insaturación se duplica su actividad. Sin embargo estos resultados no son concluyentes, ya que no se puede comparar del todo el comportamiento de los anillos y las cadenas individuales con el comportamiento de los fenoles de cadena larga.

**Tabla 10.** Estructura química y actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori* de diversos compuestos.

Compuesto	Estructura química	CMI $\mu\text{g/ml}$
Ácido benzoico		>200
Ácido salicílico		>200
Ácido parahidroxibenzoico		>200
Aldehído parahidroxibenzoico		>200
Ácido gálico		>200
Trans 2-hexenal		50



Trans 2-octenal		<b>50</b>
hexanal		<b>&lt; 6.25</b>
octanal		<b>100</b>
Vainillina		<b>&gt;200</b>
Ácido cinámico		<b>&lt; 6.25</b>
Ácido caféico		<b>&gt;200</b>
mAAref y mAA-I		<b>12.5-25</b>
Mezcla de aldehído anacárdicos.		<b>≤ 6.25</b>

Así pues, resultaba necesario analizar la actividad individual de los fenoles de cadena larga en los que sugerimos que el grupo funcional y/o el número de hidroxilos en el anillo pueden ser importantes. Un indicio de esto puede ser interpretado a partir de los resultados obtenidos con algunas moléculas relacionadas como es el ácido cinámico, el cual presenta una CMI < 6.25  $\mu\text{g/ml}$  pero cuando se le agregan dos grupos hidroxilos en el anillo (ácido caféico) pierde por completo la actividad CMI >200  $\mu\text{g/ml}$  (tabla 10). Por otro lado, el largo y el número de insaturaciones de la cadena también deben ser explorados con mayor detalle.

#### 4.10. Separación de la mezcla de ácidos anacárdicos por cromatografía líquida de alta presión HPLC.

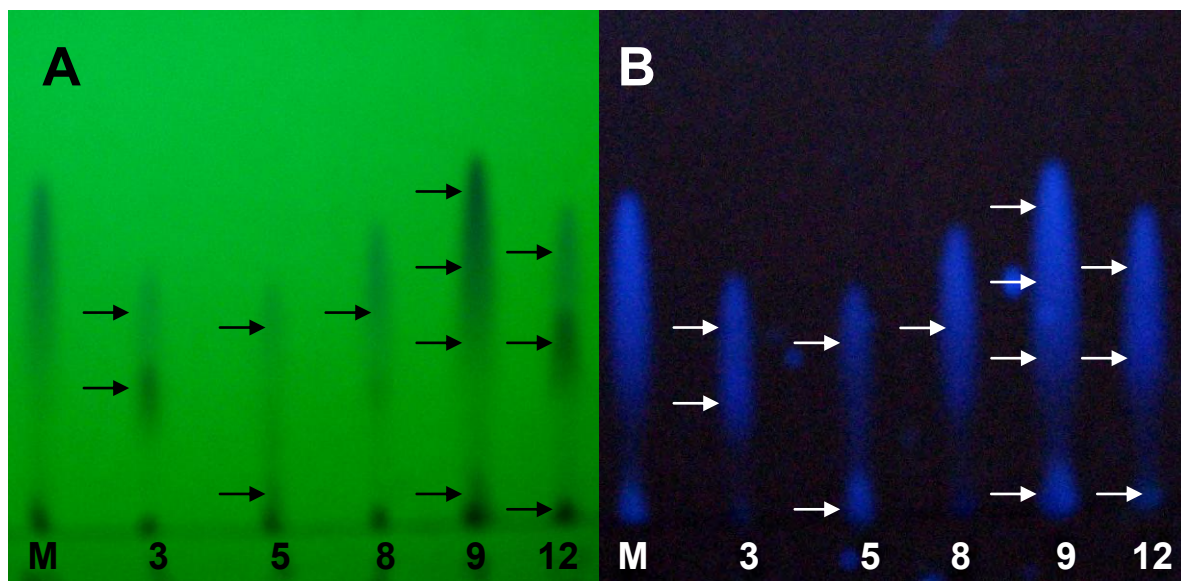
Con el propósito de analizar por separado cada uno de los ácidos anacárdicos y determinar la importancia del largo de la cadena, la mAAREf se sometió a una separación por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (figura 27b, tabla 11). El análisis en CCF de las fracciones obtenidas, sugirió la presencia de ácidos anacárdicos en 5 picos mayoritarios (3 (13.42 %), 5 (30.8 %), 8 (29.5 %), 9 (15.43 %) y 12 (10.73 %)), lo cual coincidía con el análisis de CG/EM realizado a la mezcla<sup>124</sup>. Sin embargo, al intentar asociar las cinco estructuras químicas de los ácidos anacárdicos (C<sub>15:0</sub> (50 %), C<sub>16:0</sub> (6.4 %), C<sub>17:0</sub> (28.8 %), C<sub>19:0</sub> (8.5 %) y C<sub>19:1</sub>(6.4 %)) con los picos, comparando las concentraciones y el orden de elución en la columna, no se encontró una correlación clara.

Al analizar la cromatoplaqueta en varios sistemas de elución, se observa que los diferentes picos no se encontraban puros y que a excepción del pico 8, mostraban dos o tres compuestos con fluorescencia adicionales, muchos de los cuales no se aprecian en la mezcla completa (figura 26 A y B).

**Tabla 11.** Fracciones colectadas en HPLC de la mAAREf.

Fracción	Tiempo de retención	Mg	Análisis en cromatografía en capa fina Hexano-AcOEt 8/2
0	2-38	7.4	No se resuelve y no hay fluorescencia
1	17	-----	No se resuelve y no hay fluorescencia
2	18	-----	No se resuelve y no hay fluorescencia
3	39.5	5	Fluoresce
4	38.1	-----	Fluoresce
5	40.7	19.9	Fluoresce
6	45.7	****	****
7	47.1	****	****
8	52.1	22	Fluoresce
9	56.1	8.8	Fluoresce
10	60.1	****	****
11	68.5	-----	Fluoresce
12	69.2	7	Fluoresce

----- No se pudo pesar. \*\*\*\* Se desecho ya que la cantidad era escasa. Fluorescencia a 365nm.



**Figura 26.** Cromatoplasas en UV de los 5 picos mayoritarios. M: mAref completa. Picos 3, 5, 8, 9 y 12 obtenidos por HPLC. Las flechas señalan los distintos compuestos que contiene cada pico. Para el caso del pico 9, la presencia de las tres primeras flechas no es clara, sin embargo en otros sistemas de elución de menor polaridad se resuelven perfectamente. Placas a 254 nm (A) y 365 nm (B), eluidas a 6:4 hexano/AcOEt.

Las muestras se analizaron por RMNH<sup>1</sup> y para el caso en particular del pico 5 y 8 también se hicieron por RMNC<sup>13</sup>. Con excepción del pico 3, todos mostraron en RMNH<sup>1</sup> el perfil típico asignado para los compuestos del tipo de los ácidos anacárdicos, presentando las siguientes señales diagnósticas (tabla 12).

- 1.- Un sistema ABC trisustituido en las posiciones 1, 2 y 6.
- 2.- Un multiplete asignable a los protones de los metilenos alifáticos en  $\delta$ 1.25.
- 3.- Un triplete (3H, J= 7.5 Hz) característico para un metilo alifático terminal en  $\delta$ 0.95 - 0.99.

El espectro de RMNH<sup>1</sup> del pico 8 muestra además un multiplete centrado en  $\delta$ 5.34, que integra para dos protones asignables a una doble ligadura. También, se registró una señal que integra para cuatro hidrógenos asignables a dos grupos metilenos vecinos a una doble ligadura en  $\delta$ 2.02, así como una señal en  $\delta$ 11 correspondiente al protón del grupo carboxilo. La señal de  $\delta$ 1.25, integra para 26 protones. En el espectro de RMNC<sup>13</sup> se corroboró el perfil, con las señales de desplazamientos para grupos metilenos  $\delta$ 36.7 (C-1'),  $\delta$ 32.25 (C-2'),  $\delta$ 29.52 (C-3'),  $\delta$ 29.71 (C-4'),  $\delta$ 29.78 (C-

5'),  $\delta$ 29.90 (C-6'-C-13'),  $\delta$ 30 (C-14'-C-15') y  $\delta$ 27.32 (C-16'). La posición exacta de la doble ligadura se corrobora por  $\delta$ 129.55 (C-17'),  $\delta$ 131.71 (C-18') y la señal de  $\delta$ 20.7 (C-19'), la cual es característica de un grupo metileno que se encuentra entre una doble ligadura y un metilo terminal<sup>46,124</sup>. Las señales de los grupos metino se asignaron a los carbonos aromáticos  $\delta$ 135.62 (C4),  $\delta$ 122.96 (C5),  $\delta$ 116.08 (C3), así como a los carbonos alifáticos  $\delta$ 129.55 (C-17'),  $\delta$ 131.71 (C-18'). La señal de  $\delta$ 14.60 (C20') se asignó al metilo alifático. Las señales correspondientes a carbonos cuaternarios son atribuibles al carbonilo  $\delta$ 175.84 (COOH) y a los carbonos aromáticos  $\delta$ 110.59 (C1),  $\delta$ 163.84 (C2) y  $\delta$ 147.99 (C6). La estructura propuesta corresponde a las figuras 28 y 29.

El espectro de RMNH<sup>1</sup> del pico 5, muestra además cinco multipletes, cuatro de ellos integran, cada uno para un protón, centrados en  $\delta$ 5.29,  $\delta$ 5.44,  $\delta$ 5.65 y  $\delta$ 5.91. El quinto en  $\delta$ 6.25 integra para cuatro protones. También, se registraron dos señales que integran para dos hidrógenos asignables a dos grupos metilenos vecinos a dobles ligaduras, centradas en  $\delta$ 2.06 y  $\delta$ 2.18, así como una señal en campo bajo de  $\delta$ 11 correspondiente al protón del grupo carboxilo. Por último, la señal  $\delta$ 1.25 en el espectro de RMNH<sup>1</sup>, integra para 24 protones. En el espectro de RMNC<sup>13</sup> se confirma el núcleo base al mostrar señales para ocho grupos metinos alifáticos en  $\delta$ 128.26 (C16'),  $\delta$ 123.24 (C17'),  $\delta$ 131.82 (C18'),  $\delta$ 132.41 (C19'),  $\delta$ 133.80 (C20'),  $\delta$ 134.98 (C21'),  $\delta$ 123.63 (C22') y  $\delta$ 125.67 (C23'). La señal en  $\delta$ 21.1, es característica de un grupo metileno que se encuentra entre una doble ligadura y un metilo terminal. Las señales de desplazamiento químico en  $\delta$ 36.7 (C-1'),  $\delta$ 32.25 (C-2'),  $\delta$ 29.48 (C-3'),  $\delta$ 29.53 (C-4'),  $\delta$ 29.63 (C-5'),  $\delta$ 29.7 (C-6'),  $\delta$ 29.8 (C-7'-C-11'),  $\delta$ 29.9 (C-12'),  $\delta$ 30 (C-13'),  $\delta$ 33.1 (C-14') y  $\delta$ 27.70 (C-15') se asignaron a metilenos alifáticos. Las señales en  $\delta$ 135.57 (C4),  $\delta$ 122.93 (C5),  $\delta$ 116.0 (C3) se asignaron a los carbonos aromáticos. La señal en  $\delta$ 14.5 (C25') se asignó al metilo alifático. Las correspondientes a carbonos cuaternarios son atribuibles al carbonilo  $\delta$ 175.6 (COOH) y a los carbonos aromáticos  $\delta$ 110.6 (C1),  $\delta$ 163.8 (C2) y  $\delta$ 147.9 (C6). La estructura propuesta corresponde a la indicada en las figuras 30 y 31.

El espectro de RMNH<sup>1</sup> del pico 12 mostró un patrón similar al del pico 8, con excepción de que la señal en  $\delta$ 1.25 asociada a grupos metilenos alifáticos, integró para 36 protones, indicando que la cadena es más larga que la del pico 8, así como la ausencia de la señal  $\delta$ 11, correspondiente al protón del grupo carboxilo. La estructura propuesta se muestra en la figura 32.

El espectro de RMNH<sup>1</sup> del pico 9 no mostró diferencia con respecto al pico 5. Se observan claramente los multipletes que indican la presencia de cuatro dobles ligaduras, al igual que la señal de  $\delta$ 1.25 asociada a grupos metilenos alifáticos, la cual también integra para 24 protones. Al igual que el espectro del pico 12, no muestra la señal correspondiente al protón del grupo carboxilo. La estructura propuesta corresponde a la figura 33.

La cantidad de muestra obtenida para el pico 3 no fue suficiente para realizar el análisis por RMNH<sup>1</sup>.

El espectro de RMNH<sup>1</sup> del pico 8, presenta las señales diagnósticas casi idénticas al ácido anacárdico 6-[16 (Z)-nonadecenil] ácido salicílico reportado recientemente como un nuevo compuesto de *A. adstringens*<sup>31</sup> y que difiere en la posición de la doble ligadura del que originalmente estaba presente en la mAAREf, el 6-[15 (Z)-nonadecenil] ácido salicílico<sup>124</sup>. Sin embargo, presenta una diferencia en la integración de la señal  $\delta$ 1.25 en RMNH<sup>1</sup>, la cual lo hace para 26 protones, en lugar de 24, lo que indica que es un compuesto con una cadena alifática de 20 átomos de carbono (figuras 28 y 29). Una posibilidad es de que se trate del 6-[15 (Z)-nonadecenil] ácido salicílico y que el aumento de dos protones se deba a que el pico presenta algunas impurezas, no obstante la señal en  $\delta$ 20.7 en RMNC<sup>13</sup>, es característica de un grupo metileno que se encuentra entre una doble ligadura y un metilo terminal, indicando que es más factible que se trate del 6-[16 (Z)-nonadecenil] ácido salicílico<sup>46</sup>. Este compuesto nunca se encontró inicialmente en la mezcla que estuvimos trabajando y para el caso del 6-[15 (Z)-nonadecenil] ácido salicílico su concentración era de 6.48 % y el pico 8 es mucho más abundante (29.5 %).

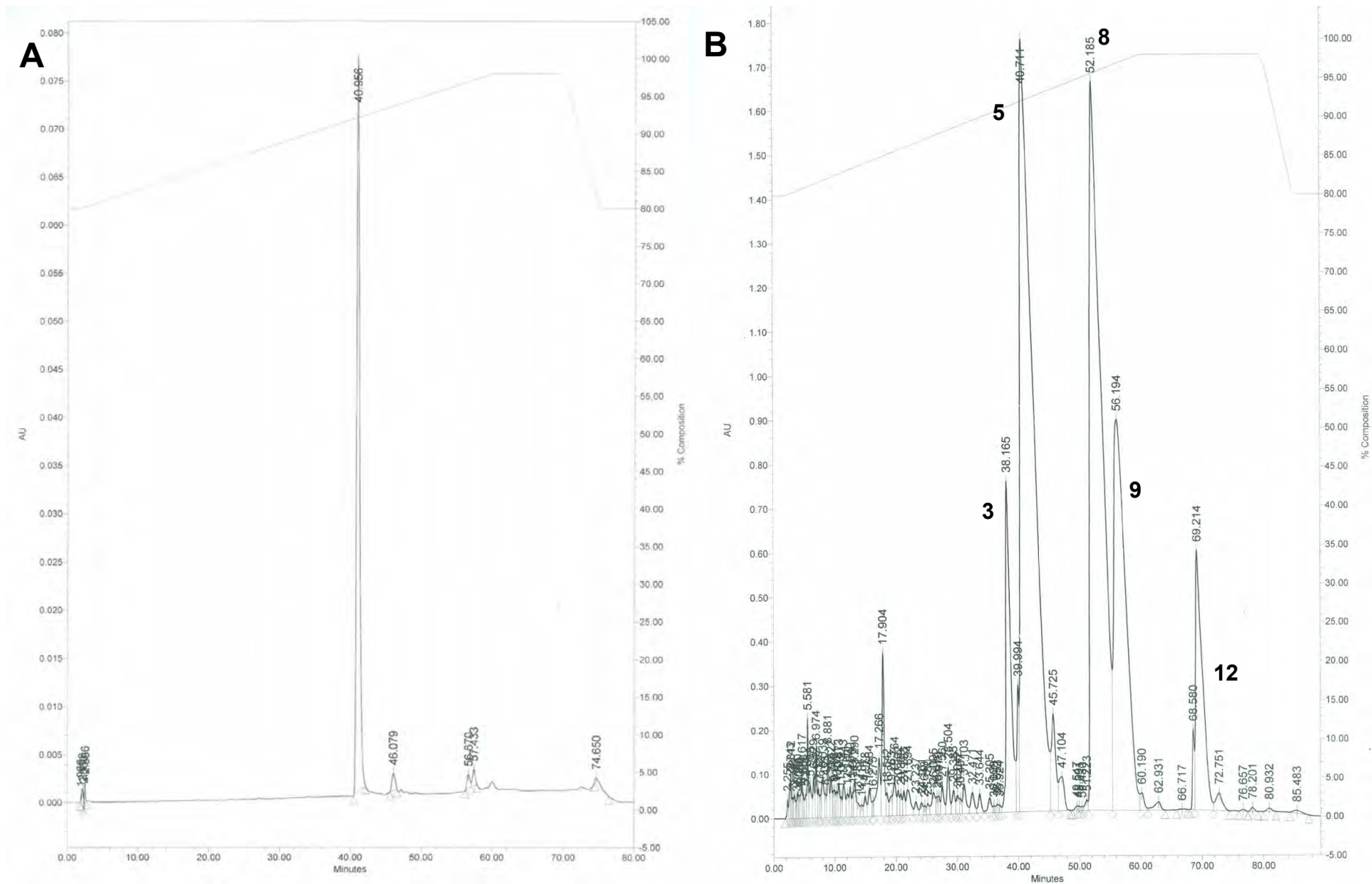
Para el caso del pico 5 por la similitud entre los tiempos de retención con la muestra de ácido anacárdico C<sub>15:0</sub> de referencia (Calbiochem), puede sugerir que corresponde al mismo compuesto, pero las señales diagnósticas en el espectro de RMNH<sup>1</sup> nos señalan que no lo son, ya que se observan claramente cinco multipletes, corroborados por las ocho señales para grupos metinos alifáticos en RMNC<sup>13</sup>, lo que nos habla de una cadena tetrasustituida. Así también, la señal en  $\delta$ 1.25 en RMNH<sup>1</sup>, integra para un total de 24 protones que correspondería a una cadena de 25 átomos de carbono (figuras 30 y 31). El pico 12, presenta las mismas señales características del pico 8, con excepción de carecer de la señal en  $\delta$ 11, correspondiente al protón del grupo carboxilo, así como la señal en  $\delta$ 1.25 que indica la presencia de una cadena de 25 átomos de carbono. Esta misma situación se observa en el espectro de RMNH<sup>1</sup> del pico 9, cuyas señales son idénticas al pico 5, con la única diferencia de que también carece de la señal del carboxilo. Estos dos compuestos podrían tratarse de cardanoles, no obstante el carácter del sistema ABC trisustituido, así como su perfil en CCF, nos indican claramente que se trata de ácidos anacárdicos y que la señal  $\delta$ 11 no pudo ser registrada por el aparato de resonancia por la cantidad de muestra que se manejó. De tal manera que las estructuras propuestas para estos dos picos corresponderían a las mostradas en las figuras 32 y 33.

Estas estructuras varían con respecto de las que inicialmente por CG/EM se identificaron en las mezclas que habíamos estado trabajando (mAA-I y mAAref), sin embargo, todas mostraron el perfil asignado para los compuestos de tipo ácido anacárdico en RMNH<sup>1</sup> y C<sup>13,46,111,138,197</sup>. Cabe señalar que en éste trabajo se realizó el estudio de CG/EM a la mAA-I, pero al no contar con una cantidad suficiente se procedió a separar por HPLC la mAAref<sup>124</sup>. La discrepancia encontrada puede deberse a que la mAAref proporcionada corresponda a una fracción diferente a la reportada en la literatura y por lo tanto contenga otro tipo de ácidos anacárdicos<sup>124</sup>. Al respecto, en aislamientos posteriores de la mezcla se observó que se arrastraba en la mayor parte de las fracciones colectadas de las columnas, de tal manera que se pudieron agrupar por lo menos tres mezclas con diferente *rf* en CCF. Por lo tanto, es factible que la diversidad de éste tipo de compuestos sea mucho mayor de la

que se ha reportado en la literatura. Por otra parte, cabría la posibilidad de que la mAAref pudiera haber sufrido un proceso de descomposición, sin embargo hasta el momento no se encuentra bien documentado dicho fenómeno en este tipo de compuestos. Se plantea que el calentamiento, así como el almacenaje por tiempos prolongados de plantas que contienen este tipo de compuestos favorece la pérdida del grupo carboxilo<sup>198</sup>. En este caso se tiene la limitante de no contar con la química completa para poder decir con exactitud la estructura, pero en nuestros resultados el carboxilo se mantuvo estable. Por otro lado, el análisis en CCF de los picos mostró que no se encontraban puros tal como se ve en la placa de CCF (figura 26). Debido a estos resultados no fue posible determinar la actividad de cada uno de los compuestos de la mezcla de manera individual.

#### **4.11. Desarrollo de un modelo animal de infección con *H. pylori* en *M. unguiculatus*.**

Hasta este momento los resultados obtenidos nos indicaban un gran potencial de la corteza de *A. adstringens* para ser efectiva en el tratamiento de la gastritis y la úlcera péptica causada por *H. pylori*; esto porque cuenta con terpenos que favorecen un efecto gastroprotector y antiinflamatorio, así como un grupo de compuestos que actúan sobre la bacteria, además de que presenta una nula o baja toxicidad<sup>8,13,38,96,140,141,142,152,158</sup>. Con el modelo animal se pretendía corroborar el efecto inhibidor del crecimiento de *H. pylori in vivo* de los extractos y los compuestos activos, sin embargo, también se tenía interés en el desarrollo de una terapia basada en los compuestos del *A. adstringens* para contrarrestar las patologías antes mencionadas, así como en el análisis de la reducción de efectos secundarios por medio del efecto dual de algunos de sus compuestos, como son los ácidos anacárdicos y el ácido 3-epioleanólico.



**Figura 27.** Cromatogramas de HPLC. A: ácido anacárdico C<sub>15:0</sub> (calbiochem). B: Mezcla de ácidos anacárdicos de referencia del *A. adstringens*, en el que señalan los picos principales que fueron analizados.



**Tabla 12.** Constantes espectroscópicas de RMN<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C para los picos obtenidos en HPLC.

Posición	Pico 5		Pico 8		Pico 9	Pico 12
	RMN <sup>1</sup> H δ	RMN <sup>13</sup> C δ	RMN <sup>1</sup> H δ	RMN <sup>13</sup> C δ	RMN <sup>1</sup> H δ	RMN <sup>1</sup> H δ
1	–	110.6	–	110.59	-	-
2	–	163.8	–	163.84	-	-
3	6.86(1H,dd, J= 8.4,1.5)	116.0	6.86(1H,dd, J= 8.4,1.2)	116.08	6.86(1H,dd, J= 9.6, 1.2)	6.86(1H,dd, J= 8.1, 1.3)
4	7.36(1H,t, J=7.5)	135.57	7.36(1H,t, J=7.6)	135.62	7.35(1H,t, J=7.5)	7.35(1H,t, J=7.6)
5	6.77(1H,dd, J= 7.5, 1.2)	122.93	6.77(1H,dd, J= 8.4, 1.2)	122.96	6.76 (1H dd, J= 8.7, 0.9)	6.76 (1H dd, J= 8.4,0.9)
6	–	147.9	–	147.99	-	-
COOH	11	175.6	11	175.84	-	-
1'	2.97 (2H,t, J=7.8)	36.7	2.97 (2H,t, J=7.6)	36.70	2.96 (2H,t, J=7.8)	2.95 (2H,t, J=7.6)
2'	1.60(2H,m)	32.25	1.60(2H,m)	32.25	1.60(2H,m)	1.58(2H,m)
3'	1.25 (2H)*	29.48	1.25 (2H)	29.52	1.25 (2H)*	1.25 (2H)*
4'	1.25 (2H)*	29.53	1.25 (2H)	29.71	1.25 (2H)*	1.25 (2H)*
5'	1.25 (2H)*	29.63	1.25 (2H)	29.78	1.25 (2H)*	1.25 (2H)*
6'	1.25 (2H)*	29.7	1.25 (2H)	29.90	1.25 (2H)*	1.25 (2H)*
7'	1.25 (2H)*	29.8	1.25 (2H)	29.90	1.25 (2H)*	1.25 (2H)*
8'	1.25 (2H)*	29.8	1.25 (2H)	29.90	1.25 (2H)*	1.25 (2H)*
9'	1.25 (2H)*	29.8	1.25 (2H)	29.90	1.25 (2H)*	1.25 (2H)*
10'	1.25 (2H)*	29.8	1.25 (2H)	29.90	1.25 (2H)*	1.25 (2H)*
11'	1.25 (2H)*	29.8	1.25 (2H)	29.90	1.25 (2H)*	1.25 (2H)*
12'	1.25 (2H)*	29.9	1.25 (2H)	29.90	1.25 (2H)*	1.25 (2H)*
13'	1.25 (2H)*	30.0	1.25 (2H)	29.90	1.25 (2H)*	1.25 (2H)*
14'	1.32(2H,m)	33.1	1.25 (2H)	30.0	1.25 (2H)*	1.25 (2H)*
15'	2.06(2H,m)	27.70	1.25 (2H)	30.0	2.06(2H,m)	1.25 (2H)*
16'	5.29 (1H,m)*	128.26	2.02(2H)	27.32	5.31 (1H,m)	1.25 (2H)*
17'	5.65(1H,m)*	123.24	5.34(1H)	129.55	5.64(1H,m)	1.25 (2H)*
18'	6.25(1H,m)	131.82	5.34(1H)	131.71	6.25(1H,m)	1.25 (2H)*
19'	6.25(1H,m)	132.41	2.02(2H)	20.72	6.25(1H,m)	1.25 (2H)*
20'	6.25(1H,m)	133.80	0.95 (3H,t, J=7.5)	14.60	6.25(1H,m)	1.25 (2H)*
21'	6.25(1H,m)	134.98			6.25(1H,m)	2.03(2H)
22'	5.91(1H,m)*	123.63			5.91(1H,m)	5.34(1H)
23'	5.44(1H,m)*	125.67			5.44(1H,m)	5.34(1H)
24'	2.18(2H,m)	21.1			2.16(2H,m)	2.03(2H)
25'	0.99(3H,t, J=7.57)	14.5			0.99(3H,t, J=7.57)	0.95 (3H,t, J=7.5)

CDCl<sub>3</sub>, <sup>1</sup>H [300.2 MHz, J (Hz), δ en ppm], CDCl<sub>3</sub>, <sup>13</sup>C [75.5 MHz, δ en ppm]. \* Asignación de desplazamiento no exacto.

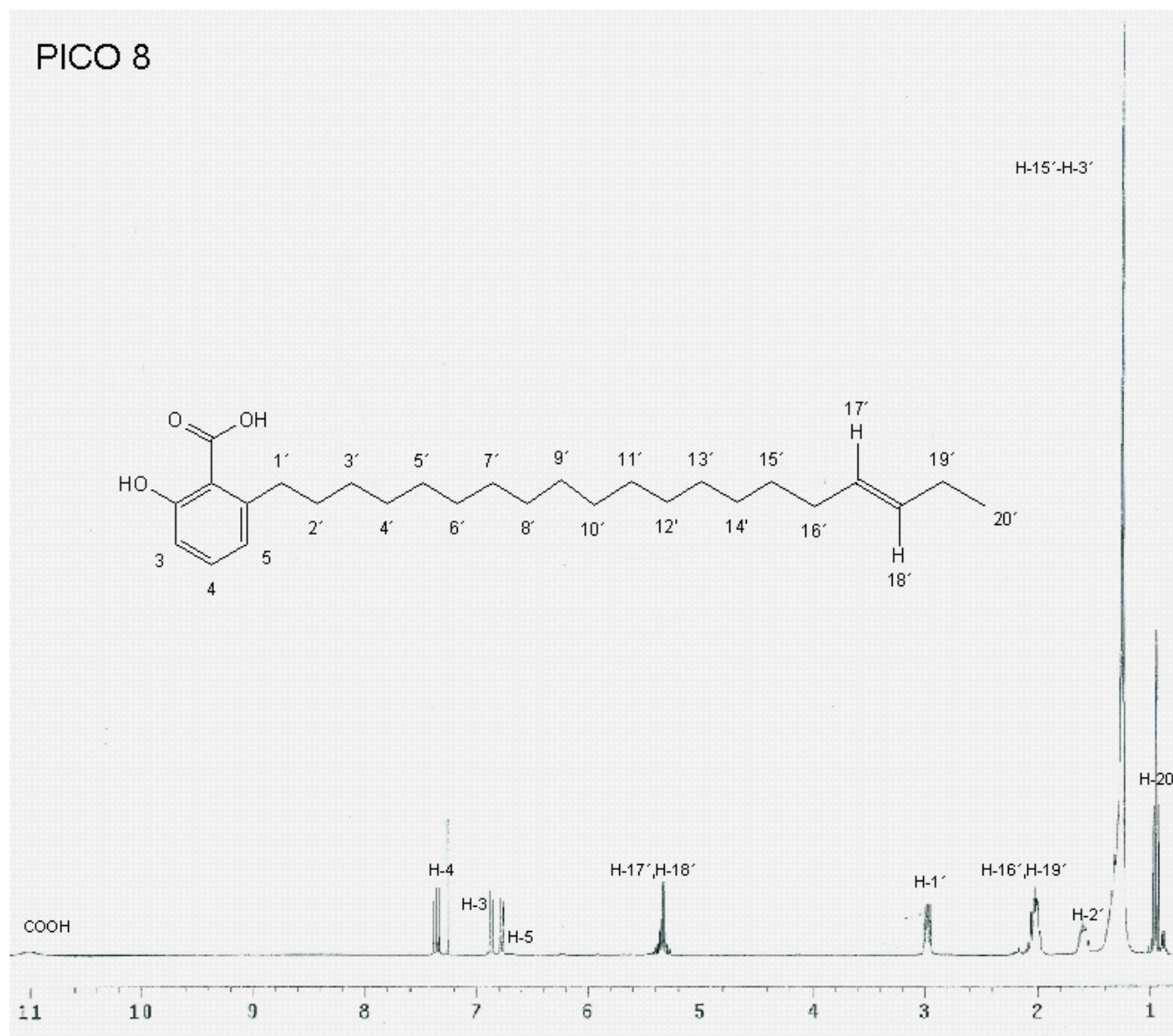


Figura 28. RMNH<sup>1</sup> del pico 8.

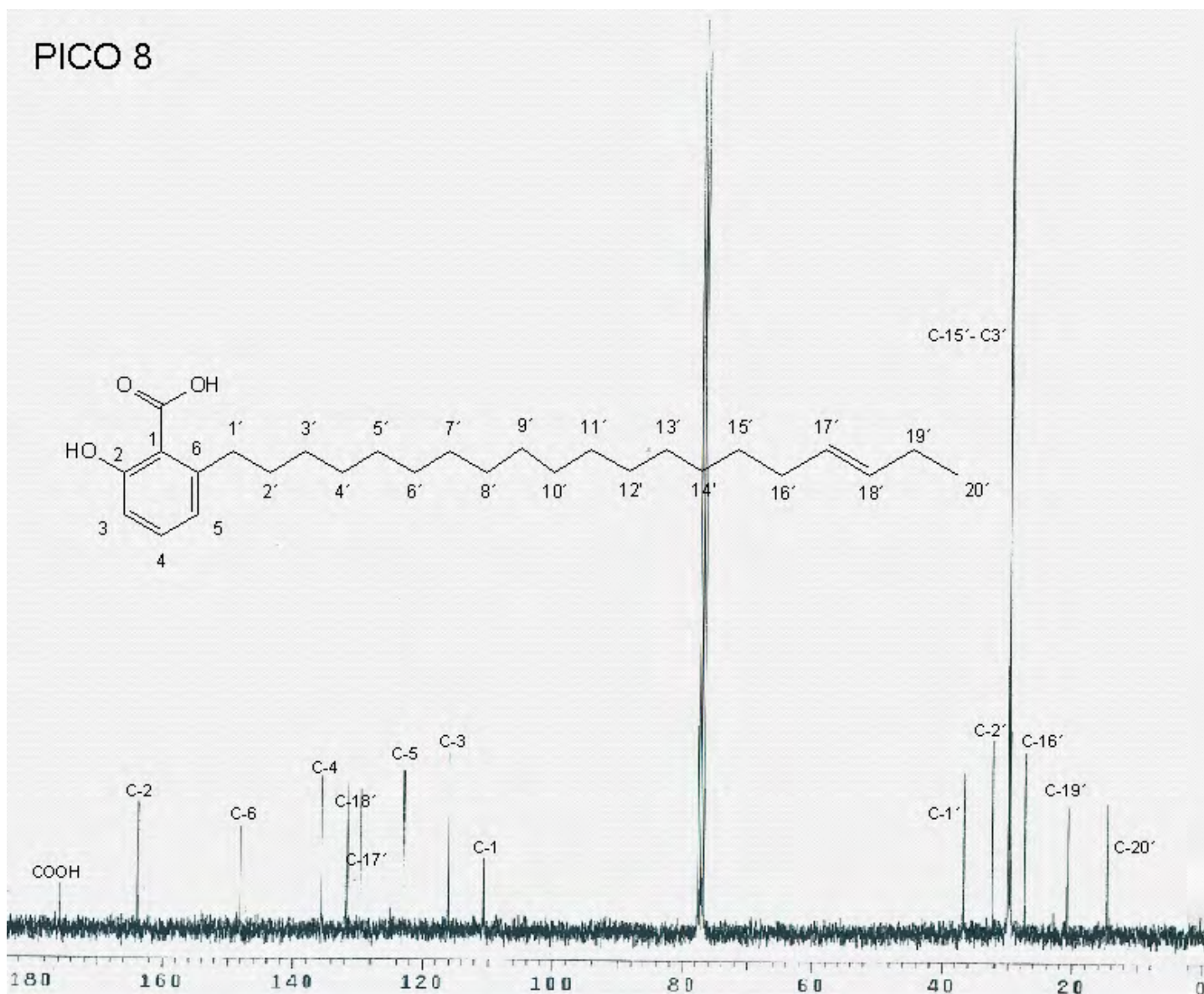


Figura 29. RMNC<sup>13</sup> del pico 8.

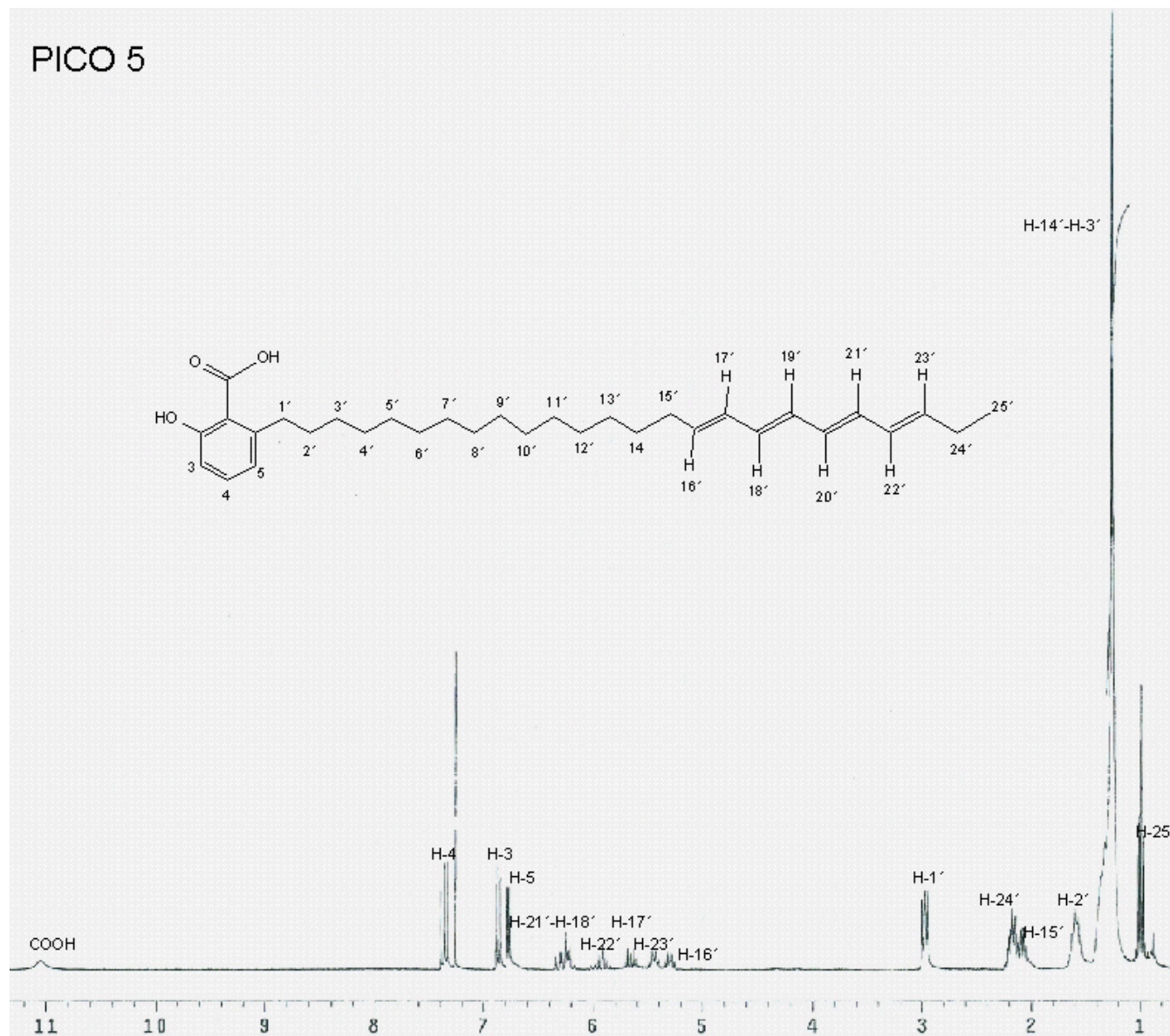


Figura 30.  $\text{RMNH}^1$  del pico 5.

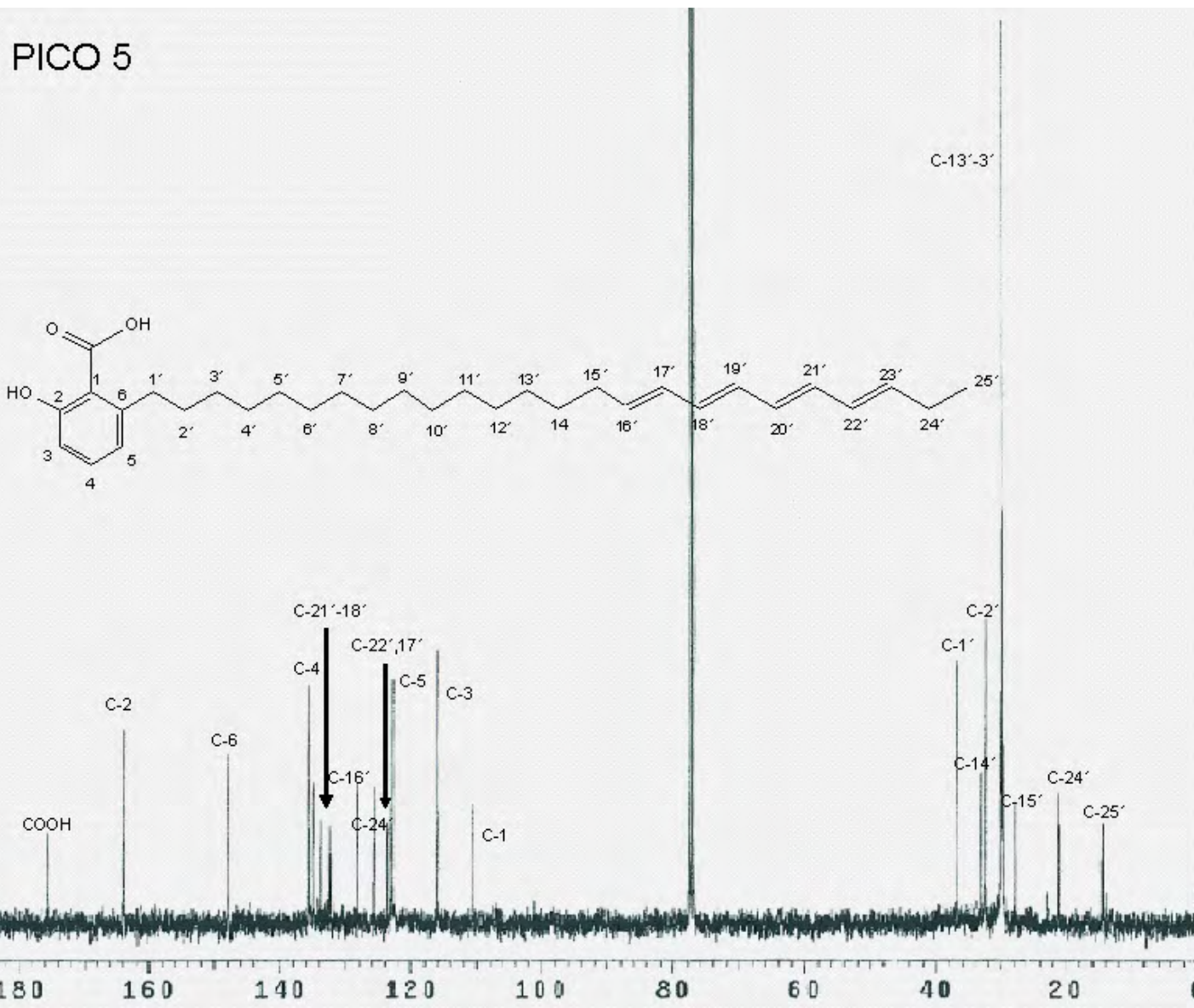


Figura 31. RMNC $^{13}$  del pico 5.

PICO 12

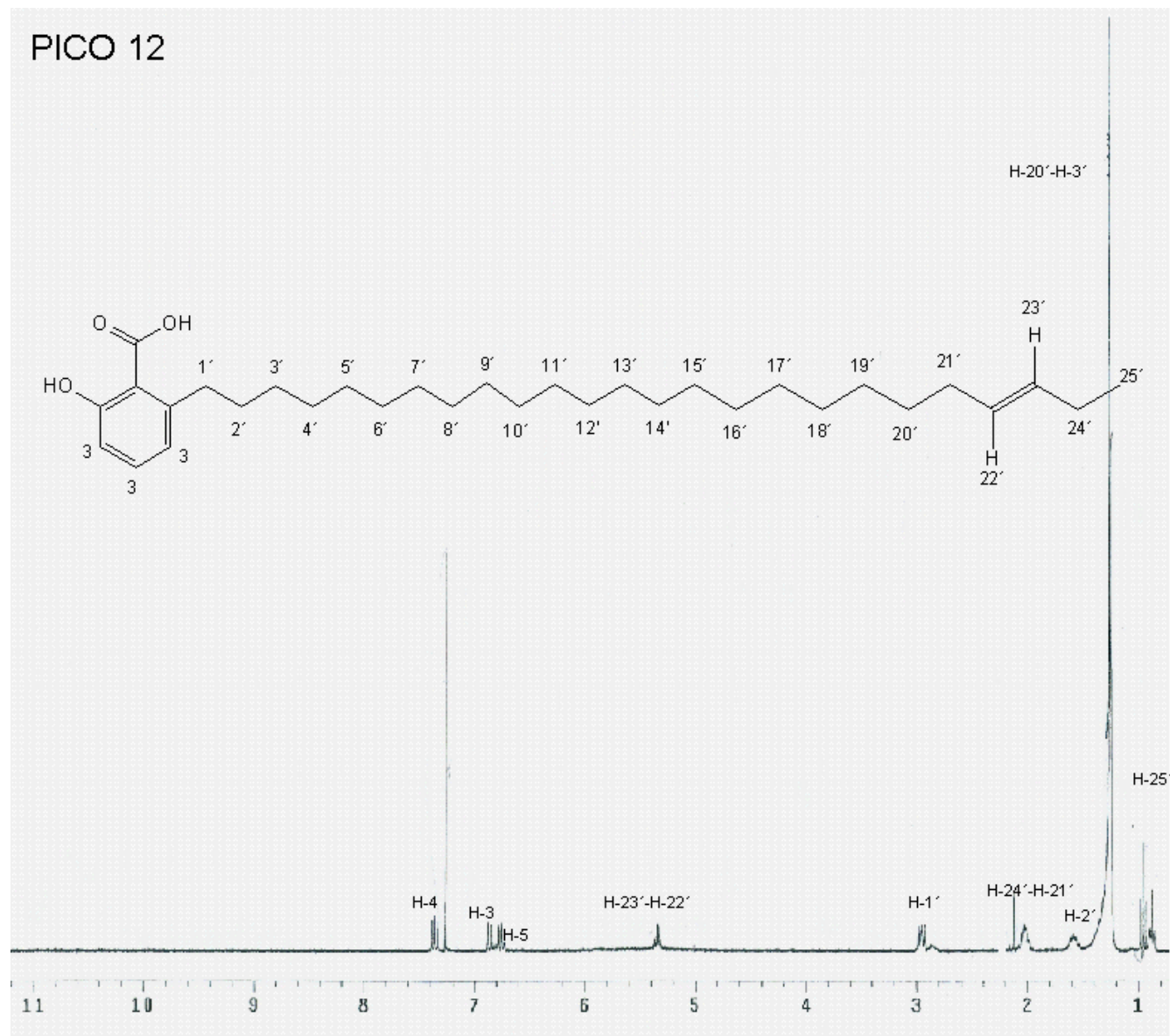


Figura 32.  $\text{RMNH}^1$  del pico 12.

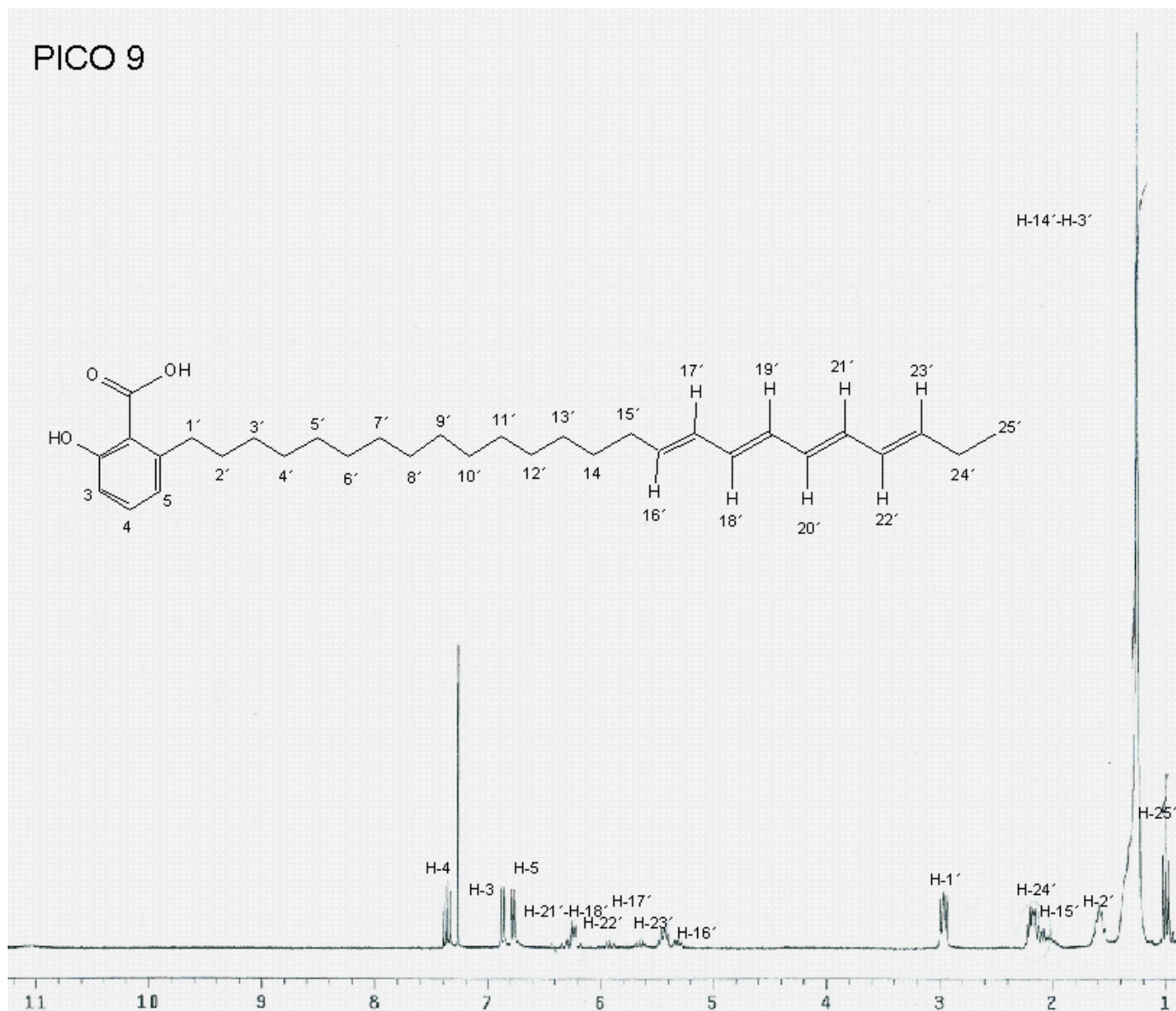


Figura 33. RMNH<sup>1</sup> del pico.

En la parte del desarrollo del modelo animal que se realizó en la Facultad de Medicina de la UNAM no se logró la infección de los animales, a pesar de haber elaborado varios protocolos en los que se inocularon diversas cepas bacterianas, se probaron diferentes tiempos de infección, así como animales de diferente procedencia. Dentro de las posibles causas por las cuales no se infectaron se encontraba la presencia de lactobacilos, de los que se reporta interfieren con la colonización de *H. pylori* y los cuales son ingeridos a través de las heces<sup>181</sup>. Para contrarrestar esto, se diseñó y aplicó un sistema anticoprofitismo el cual consistió en el empleo de pisos con mallas metálicas que evitaban tener acceso a las heces, aún así, no se logró la infección (*grupo I*).

El principal método utilizado para diagnosticar la infección en los animales fue por medio de cultivo y solo en algunas ocasiones se tuvo acceso al análisis histológico. Para el caso del primero, un problema recurrente al momento de analizar los cultivos de las muestras de estómago, era la aparición de microorganismos contaminantes, de tal manera que se ensayaron diferentes concentraciones de antibióticos selectivos. Pese a que se redujeron las contaminaciones, aún se presentaron en proporciones importantes sobre todo en diluciones bajas, lo que dificultaba identificar y sobre todo cuantificar las colonias de *H. pylori*. Este problema se resolvió mediante el diseño de una prueba denominada *Prueba Rápida en Disco de Papel*<sup>36</sup>, la cual en estos momentos se encuentra en trámite de patente y a continuación se discute<sup>37</sup>.

#### **4.12. Prueba Rápida en Disco de Papel (PRDP).**

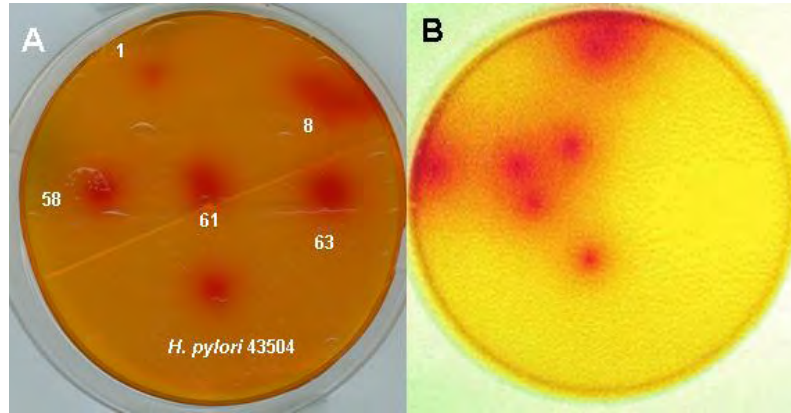
Debido a que no se contaba con un método para identificar y mucho menos cuantificar la cantidad de bacterias en los estómagos de los gerbos, se decidió implementar un *medio de cultivo diferencial* basado en la reacción de ureasa. En la literatura se encontró básicamente dos medios de este tipo, el Ham's F-12 y el Hp (ambos suplementados con rojo de fenol y urea) los cuales se sugiere



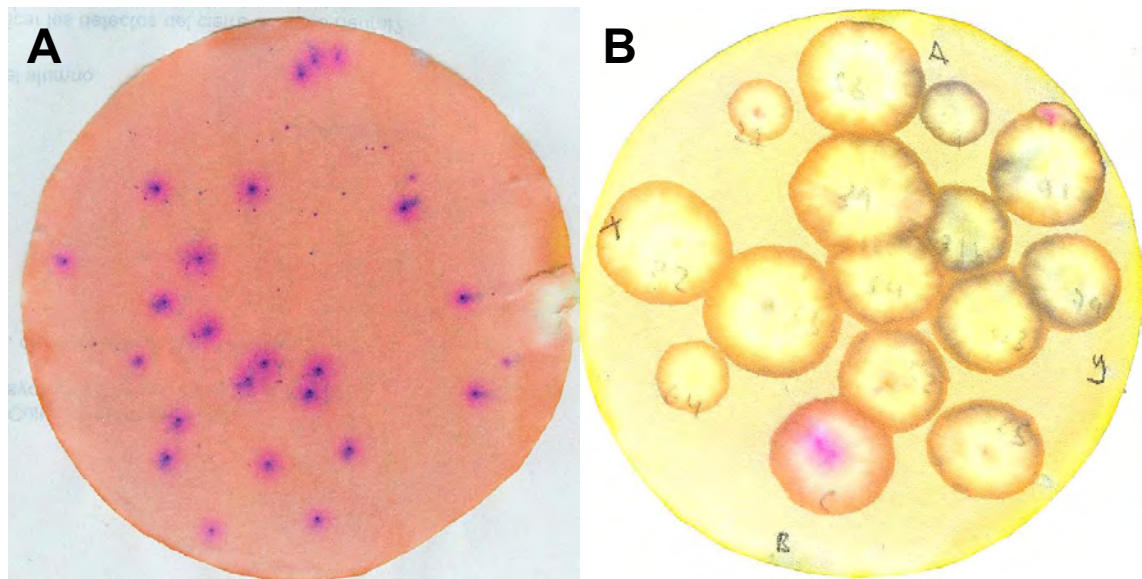
pueden funcionar para la identificación de *H. pylori* en excretas de gerbo y muestras de agua, respectivamente<sup>39, 52,187</sup>. Como en el laboratorio no se cuenta con estos medios, se decidió emplear dos bases que se utilizan rutinariamente (agar Ca y MH) suplementadas con  $\beta$ -ciclodextrinas (c), para que fueran translúcidos. Únicamente se registró crecimiento con Ca-c, de tal manera que a este se le incorporó el rojo de fenol y la urea para poder distinguir las colonias de *H. pylori* en las placas, por el cambio de color de amarillo a rojo, sin embargo, la incorporación de estos compuestos inhibió el crecimiento de la bacteria.

Algunos otros inconvenientes que encontramos para estos medios diferenciales, se refieren a que el fundamento se basa únicamente en la identificación de *H. pylori* por su actividad de ureasa y no considera la presencia de otras bacterias que también la pueden presentar. La reacción que se presenta en la placa no es capaz de diferenciar colonias de *H. pylori* de otras bacterias también ureasas positivas, tal como se muestra en la figura 34A. Así también, cuando existe un número alto de colonias *H. pylori* dificulta que se puedan cuantificar, ya que la reacción que se da en la placa se difumina en zonas grandes, tal como se muestra en la figura 34B.

Con base en estos resultados, se desarrolló una prueba para identificar colonias de *H. pylori* en cultivos complejos provenientes principalmente de muestras de estómago de gerbos y al cual se le denominó ***Prueba Rápida en Disco de Papel (PRDP)***. Esta prueba consiste en usar discos de papel filtro con dos soluciones, una para la reacción de ureasa y otro más para la reacción de oxidasa. La combinación de ambos crean un ***patrón de reacción (PR)*** característico de las colonias de *H. pylori*, que consiste en un halo de color rosa, con un centro azul (figura 35A). Otra característica de la prueba es que además permite determinar una tercera actividad de las colonias, que es la de catalasa (figura 35B).



**Figura 34. A:** Diferentes bacterias con actividad de ureasa en medio agar Ca-c con rojo de fenol y urea. **1:** *Bacillus sphaericus*, **8:** *Aerococcus urinae*, **58, 61** y **63** son diferentes aislamientos de *Corynebacterium pseudogenitalium*, así como *H. pylori* ATCC 43504. Cabe señalar que el crecimiento de *H. pylori* se ve inhibido al incorporar el indicador de pH y la urea, no obstante da una reacción en el agar. **B:** Crecimiento y reacción de actividad de ureasa mostrada por colonias de *H. pylori* en medio HP con indicador de pH y urea reportado por Degnan y colaboradores en 2003<sup>52</sup>. La concentración de rojo de fenol (0.01 %) y urea (0.06 %) es la misma en ambos medios.



**Figura 35. A.** Disco de papel que muestra el PR dado por la combinación de la actividad de ureasa y oxidasa de un cultivo puro de *H. pylori* ATCC 43504. **B.** Apariencia del disco después de realizar la prueba de catalasa.

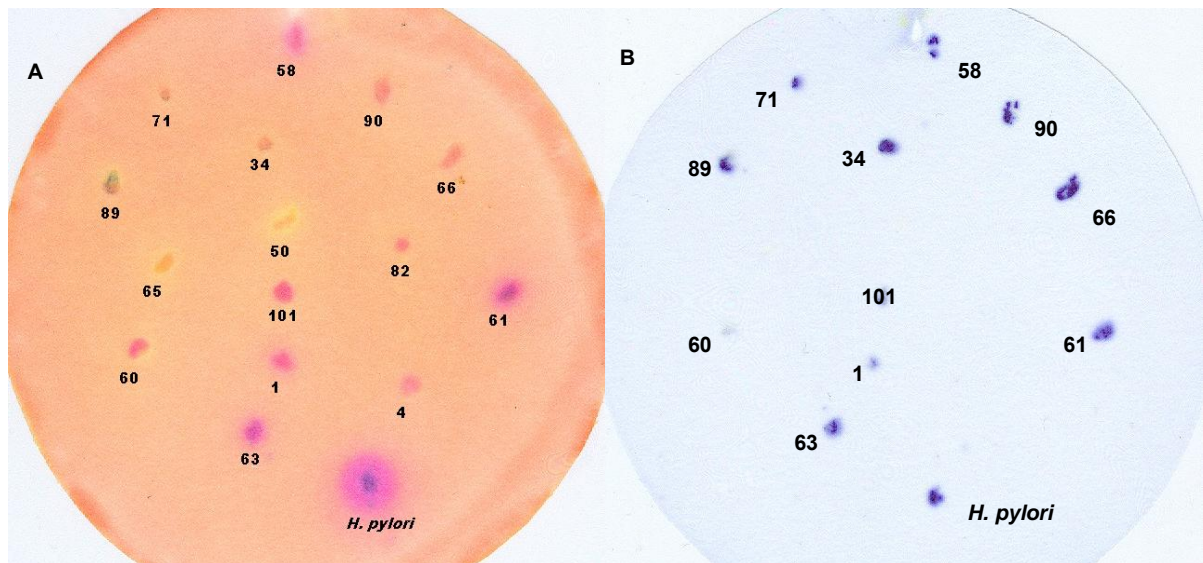
#### 4.13. Microbiota y bacterias con actividad de ureasa aisladas del *M. unguiculatus*.

Para demostrar que el PR exhibido por las colonias de *H. pylori* en la PRDP permite distinguirla de otras bacterias, incluso de aquellas que pudieran compartir alguna de las actividades de ureasa, oxidasa y catalasa, se realizó el aislamiento de microbiota de distintas muestras provenientes de gerbos. De dos animales se obtuvieron un total de 107 aislamientos, la relación con respecto a las muestras fue: 23 % del estómago, 20 % del bolo alimenticio del estómago, 26.3 % del ante-estómago, 3.63 % del bolo alimenticio del ante-estómago, 7.27 % del duodeno y el 19.09 % del excremento. El análisis microscópico reveló que el 38.5 % de los aislamientos correspondió a una levadura identificada por el método miniaturizado API-20 C AUX, como *Candida guilliermondii*. Éste microorganismo se encontró en todas las muestras, pero fue predominante en las de estómago (48 %), bolo de estómago (52.6 %) y duodeno (57.14 %). La presencia y abundancia de este hongo difiere con estudios previos en los que se ha encontrado como microbiota mayoritaria del *M. unguiculatus* a diferentes especies del género *Lactobacillus*<sup>181,186,204</sup>. Esta diferencia puede deberse a las condiciones en que se llevó a cabo el aislamiento, así como a la procedencia de los animales, aunque hay que señalar que *C. guilliermondii* no mostró ninguna reacción positiva en la PRDP.

Del 61.5 % restante que corresponden a células bacterianas, se agruparon en 57 aislamientos finales de acuerdo a las características de la colonia, a la morfología bacteriana, así como a la muestra donde fueron obtenidas. Al analizar las actividades presentadas en la PRDP, se encontró que 25 de ellas mostraban como mínimo alguna de las tres actividades y de las cuales 19 eran ureasas positivas (figura 36).

En el disco de la figura 36A, cada uno de los aislamientos mostraron una reacción particular, no obstante los aislamientos 58, 101, 60, 1, 61, 4 y 63 presentaron una actividad de ureasa (viraje a rosa). Más aún, los aislamientos 63 y 61 muestran también una actividad de oxidasa (centro azul) al

igual que *H. pylori*. Cabe señalar que la reacción tanto de ureasa como de oxidasa que presentan las bacterias, lo hacen en gradientes tanto de intensidad como de tiempo. Para el caso de los aislamientos 90, 66, y 82 el viraje nunca llega al rosa y solo se muestra en un color naranja. Para el caso de la actividad de oxidasa (disco B) no todas las bacterias la presentan (50, 65, 82 y 4) y de aquellas que lo hacen solo la 61, 63 y *H. pylori* la reacción se da en las colonias presentes en el disco A.



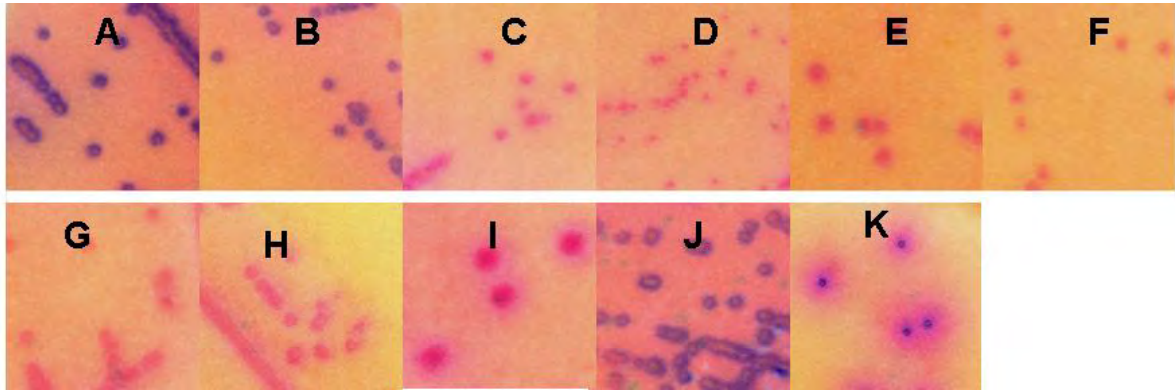
**Figura 36. A.** Disco que muestra el patrón de reacción de solo 15 aislamientos bacterianos y la cepa de colección ATCC 43504, las cuales fueron sembradas por punto en cajas de agar MH-s y al cabo de 12h de incubación se les aplicó la prueba. El número representa los distintos aislamientos bacterianos. **B.** Apariencia del disco impregnado con reactivo de Kovac (para la actividad de oxidasa) y el cual fue sobrepuesto sobre el disco A que contiene a las bacterias y el reactivo de ureasa. Un total de 57 aislamientos provenientes de muestras de gerbos fueron analizados de esta manera.

El método de siembra que se utilizó para el experimento anterior que fue por punto favorece que al cabo de 12 h de incubación se forme un cúmulo bacteriano grande. Para analizar si la reacción exhibida en el disco es la misma para colonias aisladas, se repitió el experimento, pero ahora sembrando por agotamiento y analizando el patrón de reacción que dan las colonias individuales. Bajo esta metodología solo 8 aislamientos mostraron una actividad de ureasa clara y fueron

identificadas por el método miniaturizado BBL crystal GP-ID como *Corynebacterium pseudogenitalium*, *Aerococcus urinae*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus brevis* y *Staphylococcus simulans* (tabla 13).

En muestras de estómago de *M. unguiculatus* se ha reportado el aislamiento de bacterias ureasa positivas como *Bacillus subtilis*, así como de algunos géneros como son, *Acinetobacter* spp, *Pseudomonas* spp, *Corynebacterium* spp, *Enterococcus* spp y *Staphylococcus* spp<sup>180</sup>. En nuestro estudio encontramos en muestras de estómago a *A. urinae* y *B. sphaericus*, en el bolo a *B. brevis*, en excremento a *C. pseudogenitalium* y *S. simulans*. Hay que señalar que las ureasas positivas que se aislaron únicamente en las muestras de excremento, también es muy factible que se puedan encontrar en cultivos de aislamientos de estómago debido al comportamiento coprófago del *M. unguiculatus*<sup>155,181</sup>. Cabe indicar que de los tres aislamientos identificados como *C. pseudogenitalium*, el denominado 63, no concuerda con la morfología y tiempo de crecimiento de la colonia, así como con el PR de los aislamientos 61 y 68, por lo cual puede tratarse de otra especie o ureasa positiva no-*H. pylori* y que no fue plenamente identificada a pesar del alto intervalo de confianza obtenido (0.88). (Tabla 13).

El PR de los ocho aislamientos así como de dos cepas ureasa positiva de colección, uno de ellos catalogado con una actividad de ureasa alta *Proteus vulgaris* ATCC 6808 y otra con ureasa baja *Pseudomonas auriginosa* ATCC 27853 se comparan en la figura 37. El PR exhibido por las colonias de *H. pylori* (37K), es completamente distinguible de las ureasas positivas no-*H. pylori* a pesar de que puedan compartir las mismas actividades como es el caso de *C. pseudogenitalium* y *Pseudomonas auriginosa* (figura 37 y tabla 13).



**Figura 37. Patrón de reacción de colonias bacterianas ureasas positivas en la PRDP.** Cada cuadrante representa un tamaño de 2x2 cm. A: *C. pseudogenitalium* aislamiento 58. B: aislamiento 61 y C: aislamiento 63. D: *A. urinae*. E: *B. sphaericus*. F: *B. brevis*. G: *Staphylococcus simulans* aislamiento 101 y H: aislamiento 60. I: *P. vulgaris* ATCC 6808. J: *P. auriginosa* ATCC 27853 y K: *H. pylori* ATCC 43504.

Las especies del género *Proteus* son catalogadas con una actividad de ureasa alta, característica que le permite distinguirlas de otras ureasas de la Familia Enterobacteraceae<sup>86;168</sup>. Para el caso de las colonias de *P. vulgaris* a pesar de que mostró la formación del halo, este se encuentra más limitado y es más tenue, también, la morfología de la colonia así como la actividad negativa de oxidasa, le proporcionan un PR distinto al de *H. pylori*. Por lo tanto, podemos señalar que también el tiempo de crecimiento así como la morfología de la colonia juegan un papel importante en las características que va a presentar el PR de las bacterias y que van a permitir distinguirlas de *H. pylori*.

Hay que señalar que a pesar de que el PR de *H. pylori* es distinguible del resto de las ureasas positivas no-*H. pylori* probadas en este estudio, la presencia de las segundas pueden afectar la aplicación de la prueba, debido principalmente al rápido crecimiento de las colonias comparado con las de *H. pylori* (tabla 13). Con el uso de medios suplementados con antibióticos se evitó la aparición de estas y otras ureasas positivas, aunque en algunas diluciones bajas se presentó un alto número de otras colonias contaminantes (figuras 40 y 41).

**Tabla 13.** Actividades de los aislamientos del *M. unguiculatus* y cepas de colección con actividad de ureasa en la PRDP.

Aislamientos	*Intervalo de confianza	Muestra	ureasa	oxidasa	catalasa
<i>Aerococcus urinae</i> [48]	0.79	estómago	+/-	+/-	+
<i>Bacillus brevis</i> [18]	0.87	bolo de estómago	+/-	-	+
<i>Bacillus sphaericus</i> [18]	0.99	estómago	+/-	-	+
<i>Corynebacterium pseudogenitalium</i> 63[48]	0.88	excremento	+/-	+/-	+/-
<i>Corynebacterium pseudogenitalium</i> 61[18]	0.88	excremento	+/-	+	+
<i>Corynebacterium pseudogenitalium</i> 58[18]	0.79	excremento	+/-	+	+
<i>Staphylococcus simulans</i> 101[18]	0.90	excremento	+/-	+/-	-
<i>Staphylococcus simulans</i> 60[18]	0.88	excremento	+/-	+/-	-
<i>Proteus vulgaris</i> [24]	Nd	ATCC 6808	+	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> [18]	Nd	ATCC 27853	+/-	+	+
<i>Helicobacter pylori</i> [120]	Nd	ATCC 43504	+	+	+

Estas actividades se determinaron en colonias y se realizó el análisis comparando la velocidad e intensidad de las reacciones que mostraban las de *H. pylori*.

La actividad de ureasa mostrada por las de *H. pylori* se da inmediato al contacto con el disco y se caracteriza por la formación de un halo de color rosa intenso. Para el caso de *P. vulgaris* tarda algunos segundos y el halo no se extiende mucho, así como es más tenue (+). Para el caso de las otras bacterias se da en el primer minuto y no se forma el halo (+/-). La actividad de oxidasa se considera alta (+) cuando la colonia vira a azul y baja cuando únicamente la reacción se da en el disco impregnado con 0.25 % de TMDP (+/-). La de catalasa es positiva (+) cuando se da en los primeros 3 segundos y es (+/-) cuando se da después de este tiempo.

[ ] Tiempo en horas en que crecieron colonias y se aplicó la PRDP.

\*identificadas por el método miniaturizado BBL crystal GP-ID.

El PR que presenta *H. pylori* ATCC 43504 es similar al de otras cepas de *H. pylori* como la ATCC 49503, así como de tres aislamientos gástricos (M4, M5 y MC3), no obstante dos cepas de *H. pylori* utilizadas ampliamente en el laboratorio la N2 y la 8823 resultaron dar una reacción negativa a la actividad de ureasa en el disco (figura 38), esto puede deberse a una pérdida de la actividad al ser sembrada por varios años en medios con pH neutro. Para el caso de la 2 es una bacteria

contaminante, aislada de biopsia gástrica humana y la cual tampoco mostró una reacción. Otra cepa ampliamente utilizada en el laboratorio y que mostró la formación de un halo pequeño fue la cepa 8822.

La actividad de ureasa es la prueba bioquímica de referencia más importante para la identificación de *H. pylori* y es la base para la mayor parte de las pruebas a nivel clínico<sup>129</sup>. Una posible explicación de la formación del halo rosa en las colonias de *H. pylori* sería por las características bioquímicas peculiares que presenta su ureasa, así como por su ubicación. La Km reportada para la enzima es de 0.1 mM, además de que del 5 al 10 % de ella se localiza externamente<sup>131</sup>, mientras que de manera general las ureasas de bacterias de tracto urinario, suelos o algunos miembros pertenecientes a la Familia Enterobacteriaceae presentan Km's que van de 0.7-13 mM, además de que la enzima se localiza exclusivamente en citoplasma<sup>86,131</sup>.

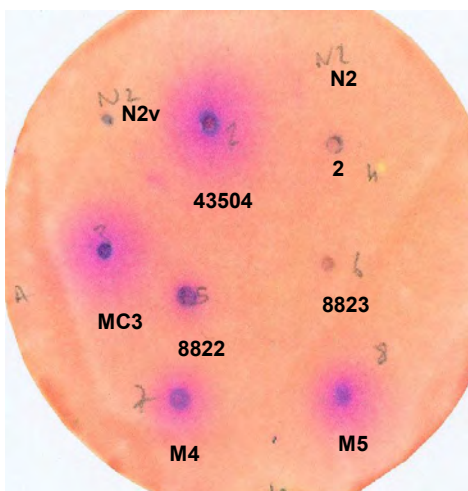
Algo muy importante que se debe señalar, es que para poder registrar la reacción de ureasa en la PRDP, se requiere de la combinación de rojo de fenol y azul de bromotimol. Al respecto se ha reportado que la mezcla de estos dos indicadores en la prueba rápida de ureasa, aumentan su sensibilidad para detectar *H. pylori* en biopsias, comparado con el único uso de rojo de fenol<sup>16</sup>.

La determinación de la actividad de oxidasa está basada en el método de Kovacs, el cual se fundamenta en la reducción del TMDP por las citocromo oxidasas de las bacterias. En la práctica se recomienda que para obtener un mejor resultado se debe de usar una solución 1 %, pero para el caso particular de las colonias *H. pylori* la actividad se registró con 0.25 % en la PRDP, en colonias crecidas en 5 días, lo cual disminuye el costo. Por otra parte, el disco impregnado ayuda a delimitar los halos de las colonias de *H. pylori* favoreciendo que se puedan contar más fácilmente.

Un posible inconveniente de la PRDP, es que el conteo de las colonias ureasa-oxidasa positivas debe hacerse en los primeros 5 minutos, ya que después de este tiempo la reacción se



esparce por todo el disco, por lo que se recomienda registrar digitalmente las imágenes y cuantificar posteriormente.

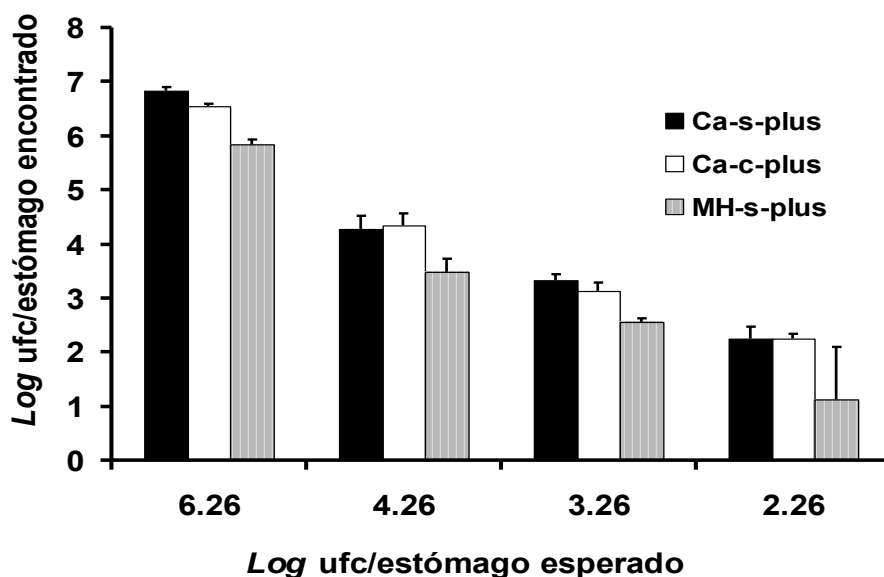


**Figura 38.** Patrón de reacción en la PRDP mostrado por diferentes cepas de *H. pylori*. Cepa de colección ATCC 43504 y los aislamientos gástricos MC3, M4 y M5. La 2 es una cepa contaminante procedente de una muestra de tejido gástrico humano. La cepa 8822, 8823 y N2 son las principales cepas utilizadas en el laboratorio de la Dra. Irma Romero. N2v es la misma cepa de N2, pero que proviene de los glicerolos originales que se tienen de la colección.

#### 4.14. Capacidad de la PRDP para identificar colonias de *H. pylori* en cultivos complejos.

Una vez demostrado que el PR exhibido por las colonias de *H. pylori* en la PRDP es específico, se procedió a determinar la sensibilidad de la prueba. Para lo cual se incorporó diferentes UFC de *H. pylori* a homogenados gástricos de estómagos de *M. unguiculatus*, los cuales se sembraron en diferentes medios de cultivo. Después de varios días de incubación se determinó el número de UFC que se requiere estén presentes en la muestras para que la PRDP las pueda detectar, así como también se analizó si disminuye la sensibilidad con la presencia de un grado alto de colonias contaminantes.

Con la PRDP se pudo determinar el número de bacterias que fueron inicialmente agregadas a las muestras de estómago, tanto a UFC altas ( $10^6$ ) como bajas ( $10^2$ ) (figura 39). Aunque con el uso de la base MH en todos los casos siempre se obtuvieron valores menores, sobre todo en la muestra con UFC bajas, incluso en uno de los triplicados no pudo ser registrada la presencia de la bacteria, razón del aumento en la dispersión que se muestra en las figuras 39 y 40.



**Figura 39** Recuperación y cuantificación aplicando la PRDP de *H. pylori* sembradas en muestras de estómago de gerbos. Ca= base Casman, MH= base Mueller Hinton, s= sangre, c=ciclodextrinas y plus = 7.5 mg/L anfotericina B, 3,500 U de polimixina B, 10 mg/L de vancomicina y 5 mg/L de trimetoprim. El valor esperado es calculado por conteo en placa en medio Ca-s-plus que es donde se obtiene la viabilidad más alta.

Por otra parte, el método es capaz de indicar la presencia de un bajo número de colonias de *H. pylori* en cultivos con un grado alto de contaminantes (figura 41). También, hay que señalar que en ninguno de los controles en los cuales no se incorporó *H. pylori*, se registró la presencia de colonias ureasas positivas o con un PR similar a *H. pylori*.

Con estos resultados, se demostró que es factible la identificación y cuantificación en cultivos complejos, utilizando la PRDP. El intervalo utilizado de  $10^2$  a  $10^6$  UFC/estómago está en función de los valores reportados para gerbos colonizados con *H. pylori*, así como al límite de detección del conteo en placa<sup>82,136,149,169,203</sup>. Sobre este último punto Tan y colaboradores reportan que la cuantificación de *H. pylori* en estómago de ratón por PCR tiempo real es de 5 a 6 veces mayor que la metodología en cultivo<sup>186</sup>. Lee and Kim señalan que el límite de detección en cultivo es de log 2UFC/g de tejido gástrico de gerbo, destacando que es más sensible el uso de PCR que es de 1UFC/g<sup>104</sup>. Sin embargo Mégraud y Lehours señalan que existen varios estudios que muestran que la sensibilidad para el caso del PCR estándar es similar a la del cultivo, debido a que la sensibilidad del PCR disminuye notablemente cuando se trabaja con material biológico<sup>129</sup>. Sin embargo, el límite de detección en cultivo se puede aumentar si se concentra la muestra por centrifugación, aunque consideramos que la detección que registramos de 100-200 bacterias ya sea por estómago o por gramo de muestra, es un valor muy bueno y que puede ser aplicable perfectamente a un gran número de protocolos experimentales.

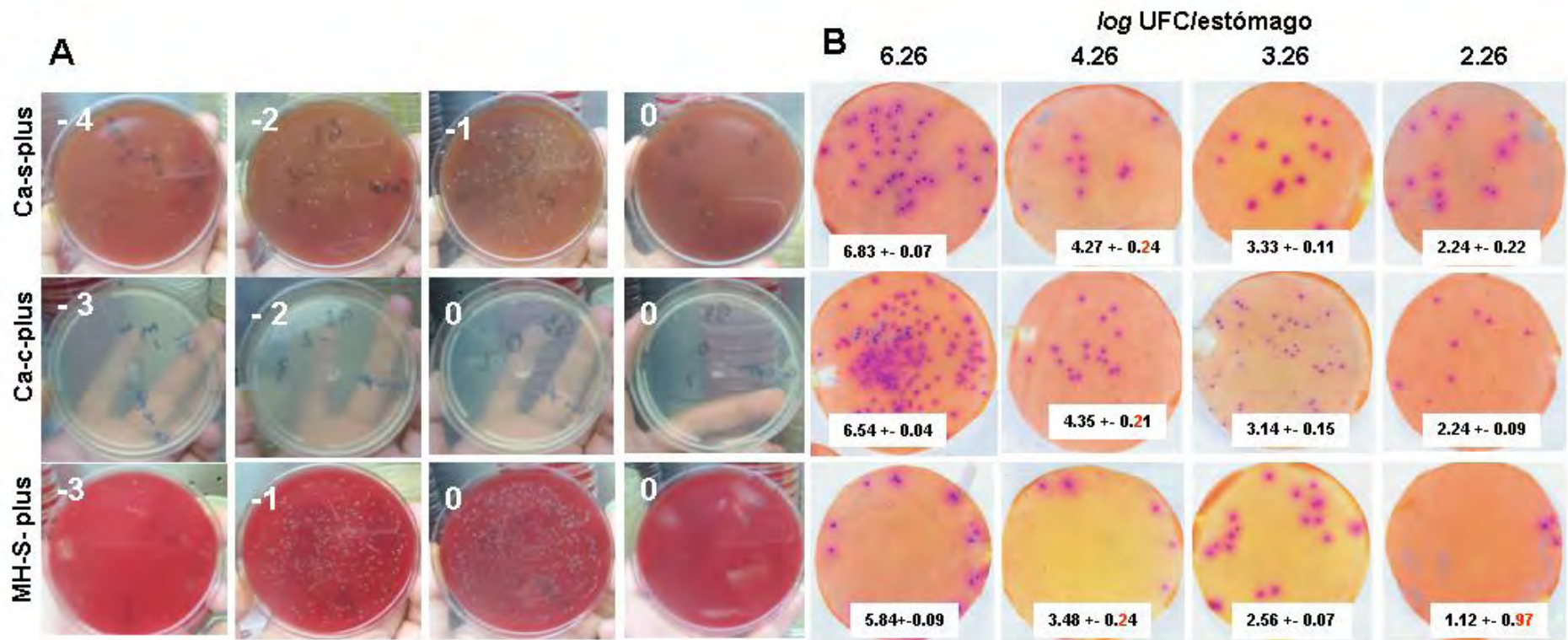
Una ventaja que se ha señalado del conteo en placa sobre el uso de PCR, es que en el primero se cuantifican bacterias viables<sup>52</sup>, sin embargo, hay que estar conscientes que la viabilidad es parcialmente subjetiva, ya que está en función del medio en que se realiza el aislamiento. Al respecto podemos decir que el uso de una base rica como es Ca, permite obtener la misma viabilidad sin importar si se suplementa con sangre o ciclodextrina o se le incorporan antibióticos. Esto no sucede cuando se usa una base menos rica como es MH, en el que no hay crecimiento usando ciclodextrinas y el presentado con sangre se ve afectado al agregar antibióticos. Así también, en el experimento en el que se incorporó *H. pylori* en muestras de estómago, la bacteria pudo ser detectada en los tres medios, pero la viabilidad varía considerablemente al usar la base MH con respecto al uso de Ca, sobre todo al momento de recuperar un número bajo de células de *H. pylori*. El uso de sangre

favorece que se obtengan colonias en un tiempo de 3-4 días, mientras que se requiere más de 5 con el uso de ciclodextrinas, sin embargo, en este último se tiene la ventaja de que se reduce notablemente las contaminaciones. La elección del medio para el aislamiento va a depender de nuestros objetivos, pero siempre hay que considerar cual permite obtener la mayor viabilidad de la bacteria.

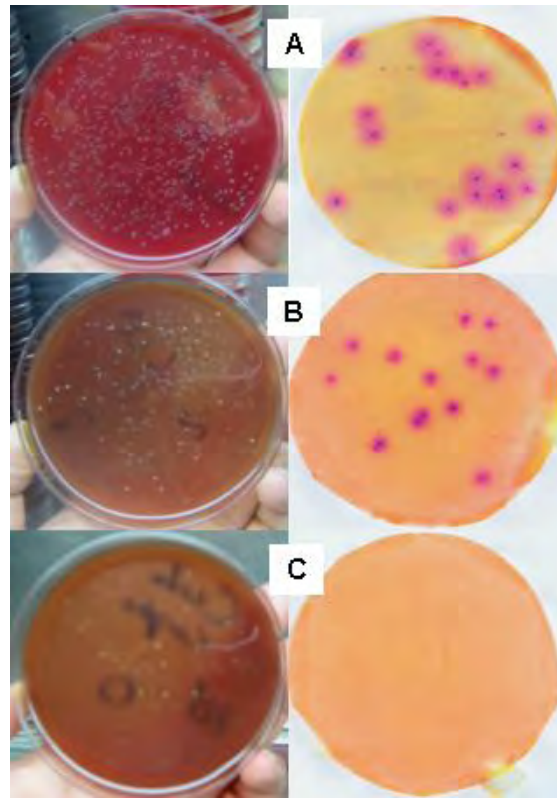
El presente trabajo se enfocó en la aplicación de la PRDP a muestras provenientes de estómago de gerbo, con base en la metodología estandarizada y en los resultados obtenidos, este novedoso método puede ser aplicado a otras muestras como serían de agua, alimentos, así como también a excretas de gerbos para el diseño de un método no invasivo. Hasta el momento solo se ha aislado *H. pylori* de muestras de estómago, sin embargo se aplicó la prueba a muestras de agua, a las cuales se les incorporó *H. pylori* a diferentes UFC. La viabilidad de la bacteria disminuyó notablemente, pero la prueba es capaz de registrarla cuando se encuentra a una concentración igual o mayor de 10,000 UFC/ml en agua corriente.

Con estos resultados podemos decir que la PRDP es un método aplicable al conteo en placa, para identificar de manera rápida, eficiente y sencilla las colonias de *H. pylori* en muestras provenientes de estómagos de gerbos y tiene la ventaja sobre otros métodos de no restringir su uso a ciertos medios de cultivo, así como también al no incorporar los reactivos para la identificación en los mismos, no interfiere con la viabilidad de la bacteria. Es un método sencillo, rápido, de bajo costo y accesible para poder ser considerado como un método de rutina.

Hay que mencionar que a pesar de contar con este método en cuatro gerbos (*Grupo II*) (laboratorio de la Facultad de Medicina de la UNAM) con 10 semanas de infección y reinoculados seis veces más con *H. pylori* ATCC 43504, no se logró registrar la presencia de la bacteria en los cultivos aplicando la PRDP.



**Figura 40. A:** Cajas de agar con tres combinaciones distintas de medios opacos (Ca-s-plus y MH-s-plus) y translúcido (Ca-c-plus). Las cajas fueron inoculadas con muestras de estómago de gerbos con distintas UFC: log 6.26, 4.26, 3.26 y 2.26. El número en cada caja señala la dilución en que se realizó la prueba. **B.** Muestra los correspondientes discos de la PRDP, en los cuales el patrón de reacción de las colonias *H. pylori* facilita la cuantificación. En la parte superior están los valores de UFC de *H. pylori* esperados y en los cuadrantes blancos en cada disco, está el valor calculado con su respectiva desviación estándar.



**Figura 41.** Cultivos complejos obtenidos de estómagos de gerbos a los que se les incorporó *H. pylori*. A) Cajas MH-s-plus con un alto grado de contaminantes. B) Cajas Ca-s-plus con un alto grado y diversidad de contaminantes. Los discos solo muestran las dos reacciones ureasa-oxidasa positivas. C) Caja control negativo donde a la muestra estomacal no se le incorporo *H. pylori*.

#### **4.15. *Candida guilliermondii* en modelo de infección animal con *H. pylori*.**

La abundancia registrada de *C. guilliermondii* en las muestras de gerbos provenientes del BFC, permitió inferir que posiblemente es el factor que estaba evitando la colonización de *H. pylori* en los estómagos de los animales.

El análisis histológico de las muestras permitió corroborar la presencia de *C. guillermondii* en animales provenientes del BFC (*Grupo III*), la cual se encuentra perfectamente adosada a la mucosa gástrica en grandes proporciones tanto en la región del cuerpo, fondo y píloro (figura 42A).

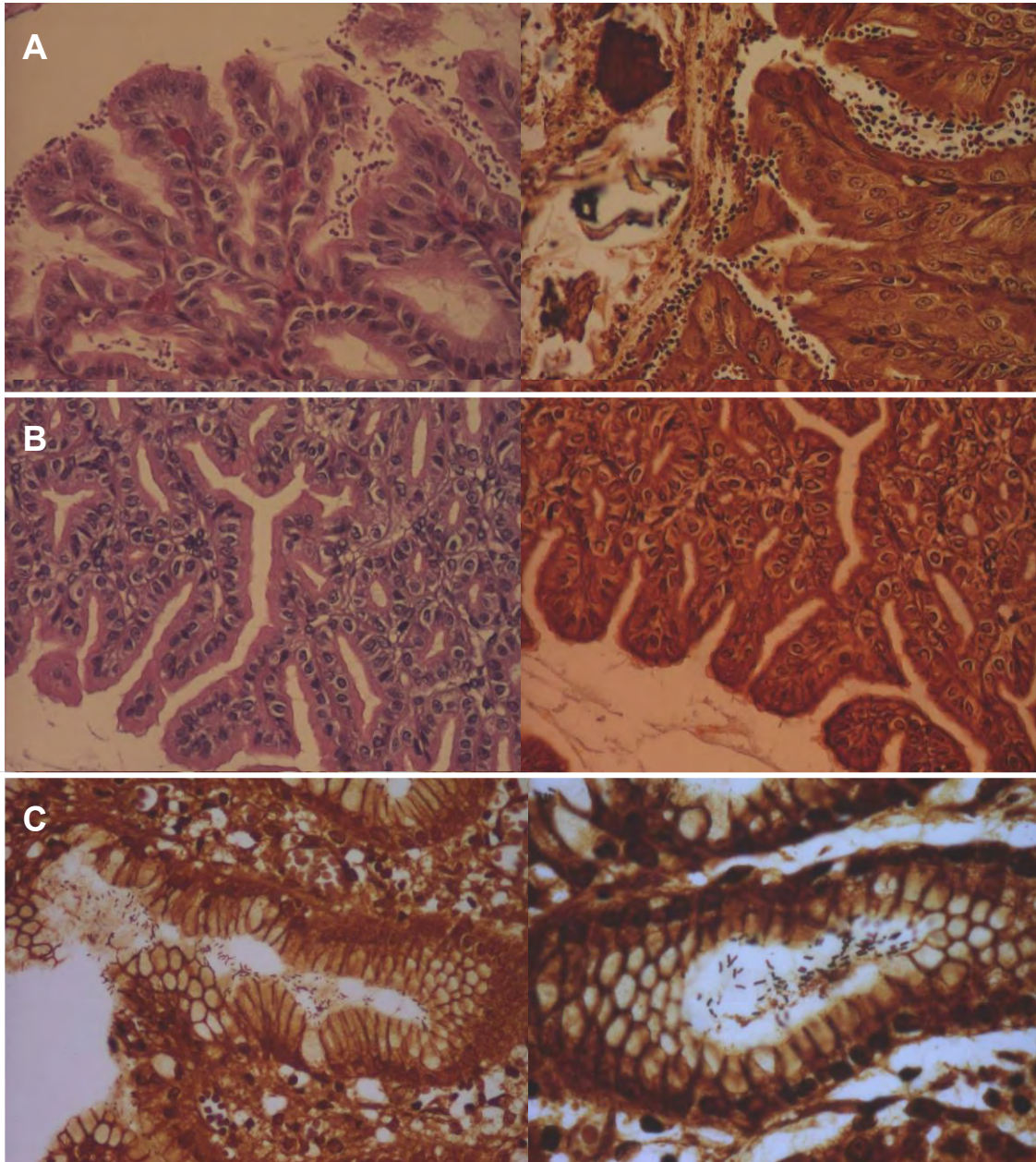
Para el caso de los animales provenientes del BINN, son animales que tenían nueve semanas de haber sido inoculados con *H. pylori* ATCC 43504 bajo las condiciones del último protocolo (*Grupo III*). Sin embargo, en ninguna de las muestras se registró la presencia del hongo o de bacilos en la luz de la mucosa gástrica, así como tampoco se observaron infiltrados de linfocitos o polimorfos nucleares en la submucosa (figura 42B).

Por otra parte a cada laminilla se le incorporaron cortes de una biopsia de un paciente diagnosticado con la infección de *H. pylori*, como control positivo. En todos se pudo observar claramente la presencia de bacilos cortos ligeramente curvados, en la luz de la mucosa gástrica (figura 42C).

Para el caso de los 80 animales con 18 meses de infección (*grupo IV*) (realizado en el Hospital Infantil Federico Gómez), hasta el momento de escribir esta tesis, se lograron analizar 11 de los inoculados con *H. pylori* y 9 controles negativos. Únicamente resultaron positivos en la PRU seis de los animales en los que se administró la bacteria (54 %). Con la PRDP se registró la presencia de colonias de *H. pylori* en cultivo, lográndose cuantificar un número de 60 y 800 UFC por muestra de estómago (figura 43).

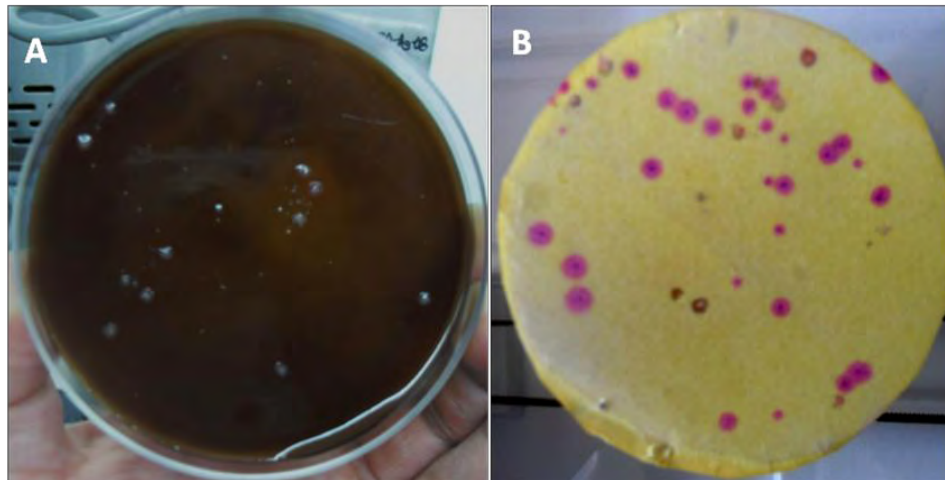
En el análisis macroscópico se pudieron identificar lesiones blanquecinas de aproximadamente un milímetro de diámetro en la mucosa gástrica de tres animales, las cuales es factible que correspondan a úlceras gástricas (figura 44).

A pesar de haber logrado la infección de los animales, por el tiempo en que se llevo a cabo ya no se pudo realizar ningún ensayo el cual es necesario para corroborar los resultados obtenidos en los estudios *in vitro*.

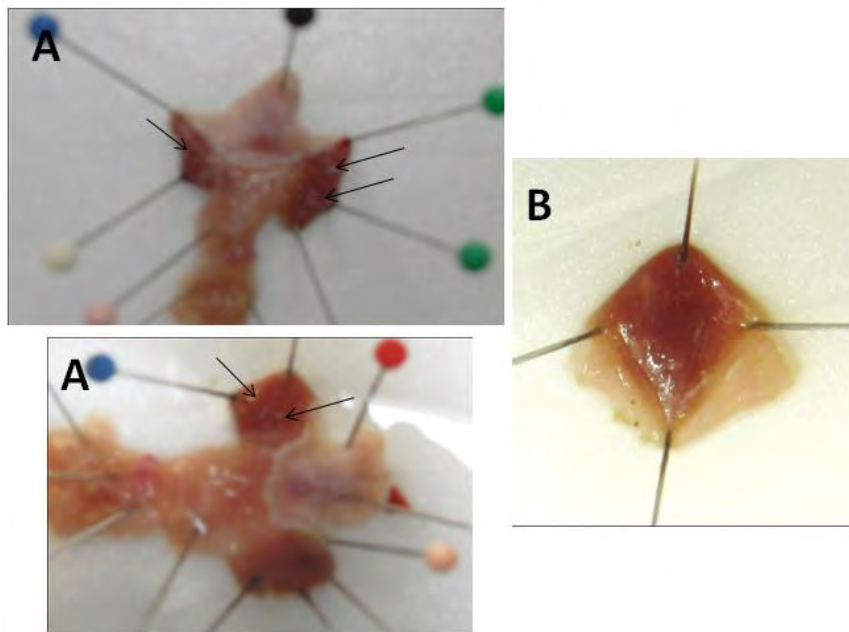


**Figura 42.** **A:** Cortes histológicos del estómago de un gerbo proveniente del BFC, en los que se observa *C. guillermondii* a lo largo del epitelio (región antro-píloro). **B:** Cortes histológicos de gerbos provenientes del BINN en el que se observa el epitelio gástrico libre del hongo (región antro-píloro. Teñidas con Hematoxilina-eosina (lado derecho) y Warthin Starry (lado izquierdo), aumento 20X. **C:** Corte histológico de biopsia de paciente infectado con *H. pylori*, procesada junto con las muestras gástricas de los gerbos y usada como control positivo (región pilórica), teñidas con Warthin-Starry 20X (lado derecho) y 100X (lado izquierdo).





**Figura 43.** A. Cultivo de mucosa gástrica de gerbo infectada con *H. pylori*. B Fotografía del disco utilizado en la PRDP que muestra el PR para colonias de *H. pylori*.



**Figura 44.** A: apariencia de posibles úlceras gástricas en la mucosa gástrica de dos animales con 18 meses de infección. B: control negativo.

#### **4.16. Sobre el posible mecanismo de acción de las plantas medicinales con actividad inhibitoria del crecimiento de *H. pylori*.**

Los vuelcos que se han presentado en los últimos años con respecto a las patologías del tracto digestivo con el descubrimiento de *H. pylori* y que continúan hasta el momento, incitan a no limitarnos únicamente a encontrar el extracto o compuesto con la actividad inhibitoria más alta, sino a tratar de entender cuál podría ser el papel de las plantas usadas por miles de años por nuestros antepasados, sobre una bacteria que ha estado con nosotros la misma cantidad de tiempo.

Desde el punto de vista del patógeno estricto, el modo de acción mostrado por las plantas medicinales que favorece la cura de la enfermedad es el efecto erradicador, seguido por el protector y el preventivo de la infección (figura 45). Estos son los principales efectos que se esperan encontrar en los laboratorios que abordan estas investigaciones, sin embargo, hasta el momento los resultados nos indican que serían inefectivas para curar las patologías gástricas inferiores crónicas (al menos en aquellos casos en los que la bacteria es la responsable) ya que no se ha demostrado claramente que algún extracto o compuesto sea capaz de erradicar a *H. pylori in vivo*<sup>2,10,14,89,111,115,122,125,144,150,183,184,185,189,211</sup>. La explicación de estos resultados puede ser de que se requieren de terapias agresivas para erradicarla dentro del estómago, como son con el empleo de varios agentes y concentraciones altas que son difíciles alcanzar con extractos de plantas<sup>1,161,162,182</sup>. Así también, la bacteria está perfectamente adaptada a su nicho y al parecer el uso de plantas el cual es mucho más antiguo a la aparición de las enfermedades emergentes asociadas a *H. pylori*, no parece haberla erradicado. Un caso en el que se plantea se logró disminuir la prevalencia de la bacteria en la población humana, fue con el uso desmedido de antibióticos en los años cincuenta<sup>9,17,24</sup>.

El panorama anterior cambia cuando observamos el posible modo de acción de las plantas bajo la perspectiva de la teoría del desequilibrio en la microecología gástrica<sup>9,17,18,19 20,21,24</sup> (Tabla 1). Bajo esta idea, el principal modo de acción que sería ventajoso es el efecto de tipo atenuante de la población bacteriana, seguido por el protector (figura 45). Si incorporamos los estudios y propuestas recientes sobre la biología de la bacteria y los resultados con plantas mencionados hasta el momento, se puede plantear la existencia de una *posible función preventiva de las plantas medicinales* al desarrollo de patologías crónicas, específicamente las gástricas inferiores mediante el efecto atenuante de poblaciones de *H. pylori*.

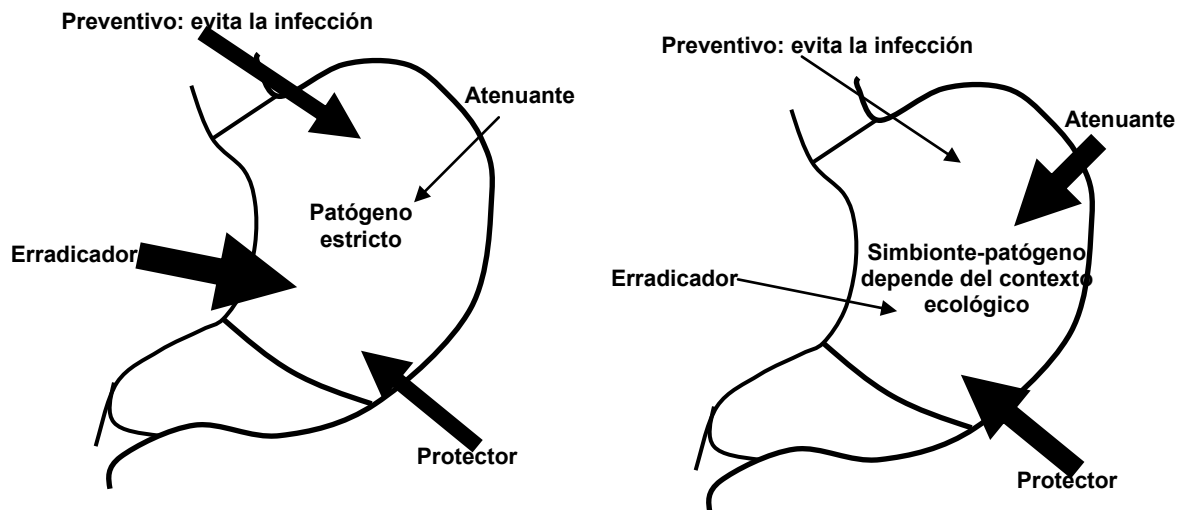
De acuerdo con la literatura es difícil suponer que un extracto de planta, logre curar o revertir las patologías crónicas, sin embargo es factible que pueden actuar como preventivas a su desarrollo, manteniendo un *equilibrio entre las poblaciones*. De acuerdo a la propuesta de Blaser y colaboradores (2007), este se regiría por el modelo de equilibrios tipo Nash (estrategias evolutivas estables) y en el cual, cuando una población bacteriana cambia de estrategia (sale de equilibrio, por ende empieza a aumentar su número y causar daño) el sistema inmune actúa sobre toda la población limitándola por restricciones en las tasas de crecimiento; incluso bajo este modelo, la inmunidad puede ser definida como la reducción de la replicación microbiana neta<sup>24</sup>. De tal modo, las plantas medicinales podrían tener un efecto atenuante sobre toda la población también de manera indiscriminada u homogénea, tal como se ha encontrado en los estudios *in vivo* realizados hasta el momento<sup>114,115,122,125</sup>. Así también, recientemente se ha relacionado el empleo de plantas tanto de uso medicinal como de aquellas consumidas frecuentemente en la dieta, con la baja incidencia de enfermedades causadas por *H. pylori* en poblaciones humanas con un alto grado de infección y con cepas consideradas altamente virulentas<sup>4,115,167, 196</sup>.

El mecanismo de acción atenuante no solo estaría previniendo el desarrollo de patologías gástricas inferiores, sino que además tendría la ventaja de que al no eliminar a la bacteria, estaría

evitando a su vez el desarrollo de las enfermedades gástricas superiores (síndrome de Barret, cáncer de esófago, reflujo gastroesofágico) las cuales se plantea la bacteria evita que se desarrollen<sup>18,19,21,24,</sup>

87

Por lo tanto, se puede pensar que los tratamientos tradicionales con plantas no han actuado, ni actúan erradicando a la bacteria como se busca con las terapias que actualmente se utilizan y es posible que antes del aumento en la incidencia de la úlcera péptica y del cáncer gástrico, la dieta basada en plantas comestibles o medicinales hayan tenido un papel fundamental en el mantenimiento del equilibrio *H. pylori*-humano, evitando el desarrollo de estas enfermedades.



**Figura 45.** Posibles mecanismos de acción de las plantas medicinales o comestibles sobre *H. pylori* y su relevancia desde el punto de vista de las dos hipótesis sobre la patogenicidad antes señaladas. El grueso de las flechas indica cual de los mecanismos sería más relevante para cada una.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo tienen la limitante de ser estudios *in vitro*, por lo que se requiere de la experimentación en modelos animales para poder definir si algún extracto o compuesto de la corteza del *A. adstringens* puede presentar un efecto atenuante de las poblaciones de *H. pylori* dentro del estómago. Así como también, si dicho efecto sería suficiente para prevenir el

desarrollo de patologías crónicas sin eliminar a la bacteria o si es capaz de revertir el daño una vez que se ha causado. El panorama para el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento es amplio y prometedor, pero solo si logramos entender primero la biología de la bacteria, la cual va más allá de visualizar a *H. pylori* únicamente como un patógeno.

## 5. CONCLUSIONES.

- Se desarrolló y propuso una metodología *in vitro* para evaluar específicamente la actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori* de extractos y compuestos puros, sin embargo los resultados deben de ser complementados con un estudio *in vivo* y un análisis de toxicidad para determinar la confiabilidad de la misma.
- La corteza de *A. adstringens* a la que se la ha atribuido un efecto gastroprotector en modelos de daño producido por agentes químicos, también contiene metabolitos que actúan directamente sobre el principal factor causante de la gastritis crónica activa, la úlcera péptica y el cáncer de estómago, la bacteria *H. pylori*.
- De los compuestos descritos en la literatura como los responsables de la actividad gastroprotectora y antiinflamatoria en modelos de daño producido por agentes químicos, el ácido 3-epioleanólico es el único que presenta un efecto inhibidor del crecimiento de *H. pylori in vitro*.
- La mezcla de ácidos anacárdicos y una de aldehídos anacárdicos, muestran el mayor efecto inhibidor del crecimiento *H. pylori in vitro*.
- Se plantea la existencia de dos modos de acción para la mezcla de ácidos anacárdicos *in vitro*, los cuales dependen de la concentración. Uno bacteriostático que se da concentraciones menores de 12.5µg/ml y otro bacteriolítico a concentraciones mayores de 30µg/ml.

- Los ácidos anacárdicos (así como otros fenoles de cadena larga) tienen un potencial para ser utilizados en las terapias de erradicación ya que: 1. Presenta actividades inhibitorias *in vitro* en el intervalo de los antibióticos comerciales. 2. Es más eficiente en comparación con otros compuestos aislados de plantas. 3. Su estructura química es sencilla, lo que puede facilitar su síntesis. 4. Su toxicidad es baja. 5.- Son estructuralmente diversos. 6.- Su presencia en otras plantas (principalmente en hojas y frutos) facilita su obtención.

- La gran diversidad que presentan los fenoles de cadena larga y los pocos estudios acerca de su actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori*, nos indican que no se ha explorado totalmente el potencial de este tipo de compuestos y aún faltan estudios para concluir que parte de su estructura es determinante para la actividad.

-En este estudio no se logró ensayar la actividad en el modelo animal, a pesar de haber logrado la infección de los animales. Éste punto resulta de suma importancia para dar mayor peso a los resultados encontrados con los estudios *in vitro*.

- Se desarrolló un nuevo método denominado Prueba Rápida en Disco de Papel, el cual es aplicable al conteo en placa y permite conocer el número de *H. pylori* viables en los estómagos de gerbos de una manera eficiente y sencilla, además de que presenta la ventaja de ser económico y accesible para poder ser considerado como método de rutina.

- Aún no podemos justificar que el uso tradicional que se le da a la corteza para el caso de la gastritis y la úlcera péptica (ya sea producida por *H. pylori* o por agentes químicos) se deba a la presencia de

los terpenos y fenoles de cadena larga, ya que no se encuentran en los extractos acuosos que consume la gente.

- El extracto acuoso presenta una actividad *in vitro* contra la bacteria, indicando la presencia de metabolitos potenciales aún no identificados.

- Aunque se pueden proponer diversos mecanismos por los cuales las plantas evitan el daño causado por la bacteria, hasta el momento el efecto atenuante y protector parecen ser los principales. Bajo esta propuesta, estos efectos son la base para el desarrollo de una terapia contra *H. pylori* más selectiva, basada en la regulación de su población más que en su erradicación.



## 6.- BIBLIOGRAFÍA.

1. Abdo-Francis JM., Uscanga DL., Sobrino CS., Rivera RJF., Huerta IF. y Tamayo de la Cuesta JL. (2007). III consenso mexicano sobre *Helicobacter pylori*. Rev Gastroenterol Mex. 72(3):137-53.
2. Ables AZ., Simon I. y Melton ER. (2007). Update on *Helicobacter pylori* treatment. Am Fam Physician. 75(1): 351-8.
3. Acevedo HR., Rojas MD., Arceo SD., Soto HM., Martínez VM., Terrazas T. y del Toro GV. (2006). Effect of 6-nonadecyl salicylic acid and its methyl ester on the induction of micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. Mutat Res. 609(1):43-6.
4. Akhter Y., Ahmed I., Devi SM. y Ahmed N. (2007). The co-evolved *Helicobacter pylori* and gastric cancer: trinity of bacterial virulence, host susceptibility and lifestyle. Infect Agent Cancer. 4(2):1-15.
5. Amieva MR. y El-Omar EM. (2008). Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. Gastroenterology. 134(1):306-23.
6. Ankli A., Henrich M., Bork P., Wolfram L., Bauerfeind P., Brun R., Schemid C., Weiss C., Bruggisser R., Gertsch J., Wasescha M. y Sticher O. (2002). Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. J Ethnopharmacol. 79(1):43-52.
7. Argueta-Villamar A., Caro LM. y Rodarte ME. (Eds.). (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Instituto Nacional Indigenista, Primera edición. México.
8. Arrieta J., Benítez J., Flores E., Castillo C. y Navarrete A. (2003). Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. Planta Med. 69(10):905-9.
9. Atherton JC y Blaser MJ. (2009). Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. J Clin Invest. 119(9):2475-87.
10. Bavington C. y Page C. (2005). Stopping bacterial adhesión: a novel approach to treating infections. Respiration. 72(4):335-44.
11. Beil W. y Kilian P. (2007). EPs<sup>R</sup>7630, an extract from *Pelargonium sidoides* roots inhibits adherence of *Helicobacter pylori* to gastric epithelial cells. Phytomedicine. 14(6):5-8.

12. Belogortseva NI., Yoon JY. y Kim KH. (2000). Inhibition of *Helicobacter pylori* hemagglutination by polysaccharide fractions from roots of *Panax ginseng*. *Planta Med.* 66(3):217-20.
13. Benítez J. (1998). Evaluación farmacológica del efecto gastroprotector de los triterpenoides de la corteza de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) en ratas wistar. Tesis de Licenciatura Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM.
14. Bergonzelli GE., Donnicola D., Porta N. y Corthésy-Theulaz IE. (2003). Essential oils as components of a diet-based approach to management of *Helicobacter pylori* infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(10):3240-6.
15. Bilk EM., Eckburg PB., Gill SR., Nelson KE., Purdom EA., Francois F., Pérez-Pérez G., Blaser MJ. y Relman DA. (2006). Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc Natl Sci USA.* 103(3):732-7.
16. Blanco-Delgado CA., Rivera P., Hernández F., Hevia F., Guillén F., Duran S. y Miranda M. (2001). Prevalencia de *Helicobacter pylori* en pacientes atendidos en el Hospital San Juan de Dios, San José, Costa Rica. *Rev Biomed.* 12(1):1-4.
17. Blaser MJ. (1992). Hypotheses on the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Gastroenterology.* 102(2):720-7.
18. Blaser MJ. (1997). Ecology of *Helicobacter pylori* in the human stomach. *J Clin Invest.* 15(100):759-62.
19. Blaser MJ. (1997). Not all *Helicobacter pylori* strains are created equal: should all be eliminated? *Lancet.* 349(9057):1020-2.
20. Blaser MJ. (1998). Helicobacters are indigenous to the human stomach: duodenal ulceration is due to changes in gastric microecology in the modern era. *Gut.* 43(5):721-7.
21. Blaser MJ. (1999). In a world of black and white, *Helicobacter pylori* is gray. *Ann Intern Med.* 130(8):695-7.
22. Blaser MJ. (2008). Disappearing microbiota: *Helicobacter pylori* protection against esophageal adenocarcinoma. *Cancer Prev Res.* 1(5):308-11.
23. Blaser MJ. y Berg DE. (2001). *Helicobacter pylori* genetic and risk of human disease. *J Clin Invest.* 107(7):767-73.

24. Blaser MJ. y Kirschner D. (2007). The equilibria that allow bacterial persistence in human hosts. *Nature*. 449(7164):843-9.
25. Borrelli F. e Izzo AA. (2000). The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytother Res*. 14(8):581-91.
26. Burger O., Ofek I., Tabak M., Weiss E., Sharon N. y Neeman I. (2000). A high molecular mass constituent of cranberry juice inhibits *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucus. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 29(4):295-301.
27. Burger O., Weiss E., Sharon N., Tabak M., Neeman I. y Ofek I. (2002). Inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucus by a high-molecular-weight constituent of cranberry juice. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 42(3):279-84.
28. Cabrita J., Oleastro M., Matos R., Manhente A., Cabral J., Barros R., Lopes AI, Romalho P., Neves BC. y Guerreiro AS. (2000). Features and trends in *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in Lisbon area Portugal (1990-1999). *J Antimicrob Chemother*. 46(6):1029-31.
29. Campo SM., Zullo A., Hassan C. y Moroni S. (2007). Antibiotic treatment strategies for *Helicobacter pylori* infection. *Recent Pat on Antiinfect Drug Discov*. 2(1):11-7.
30. Canales M., Hernández T., Caballero J., Romo de Vivar A., Ávila G., Duran A. y Lira R. (2005). Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. *J Ethnopharmacol*. 97(3): 429-39.
31. Carrazco CL. y Rivera AE. (2009). Actividad antibacteriana de compuestos aislados de la corteza de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) sobre bacterias patógenas de la cavidad oral. Tesis de licenciatura en químico farmacobiólogo. Facultad de Química. UNAM. 54 pag.
32. Cassel-Beraud AM., Le Jan J., Mouden JC., Andriantsoa M. y Andriantsiferana R. (1991). Preliminary study of the prevalence of *Helicobacter pylori* in Tananarive, Madagascar and the antibacterial activity *in vitro* of 13 Malagasy medicinal plants on this germ. *Arch Inst Pasteur Madagascar*. 59(1):9-23.
33. Castillo-Juárez I. (2005). Análisis de plantas medicinales y compuestos con actividad anti-*Helicobacter pylori*. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias. Tesis de licenciatura en biología. 100 pag.

34. Castillo-Juárez I. González V., Jaime-Aguilar H., Martínez G., Linares E., Bye R. y Romero I. (2009). Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *J Ethnopharmacol.* 122(2):402-5.
35. Castillo-Juárez I. y Romero I. (2007). Plantas con actividad anti-*Helicobacter pylori*: una revisión. *Bol Soc Bot Méx.* 80:35-61.
36. Castillo-Juárez I., Rangel-Vega A. y Romero I. (2010). Rapid paper disk test for identification of *Helicobacter pylori* in mixed cultures of gerbil gastric homogenates. *J Microbiol Method.* 83(1):20-5.
37. Castillo-Juárez I., Rangel-Vega A. y Romero I. Prueba rápida en disco de papel para identificar y cuantificar *Helicobacter pylori* en cultivos complejos. Solicitud nacional: 10 de agosto 2010, con número de registro MX-a-2010-008774.
38. Castillo-Juárez I., Rivero CF., Celis H. y Romero I. (2007). Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. *J Ethnopharmacol.* 114(1):72-7.
39. Cellini L., Allocati N., Piccolomini R., Di Campli E. y Dainelli B. (1992). New plate for growth and detection of urease activity of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol.* 30(5):1351-3.
40. Chang CC., Chen SH., Lien GS., Lee YJ., Lou HY., Hsieh CR., Fang CL. y Pan S. (2005). Anti-*Helicobacter pylori* therapy significantly reduces *Helicobacter pylori*-induced gastric mucosal damage in Mongolian gerbils. *World J Gastroenterol.* 11(7):982-5.
41. Chen D., Stenström B., Zhao CM. y Wadström T. (2007). Does *Helicobacter pylori* infection per se cause cancer or duodenal ulcer? Inadequate evidence in Mongolian gerbils and inbred mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 50(2):184-9.
42. Chiba N., Rao BV., Rademaker JVV. y Hunt RH. (1992). Meta-analysis of the efficacy of antibiotic therapy in eradicating *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol.* 87(12):1716-27.
43. Choi YH., Choi HK., Peltenburg-Looman AM., Lefeber AW. y Verpoorte R. (2003). Quantitative analysis of ginkgolic acids from Ginkgo leaves and products using <sup>1</sup>H-NMR. *Phytochem Anal.* 15(5):325-30.
44. CLSI/NCCLS. Clinical and Laboratory Standards Institute/ National Committee for Clinical Laboratory Standart (2005). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; fifteenth informational supplement. M100-S15. 25(1) M2-A8 and M7-A6.

45. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (2001). Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, Extrafarmacopea Herbolaria, Secretaria de Salud, Ciudad de México, México, pp 12-15.
46. Corthout J., Pieters L., Claeys M., Geerts S., Vanden BD. y Vlietink A. (1994). Antibacterial and molluscicidal phenolic acids from *Spondias bombin*. *Planta Med.* 60(5):460-3.
47. da Mota MV., Atallah AN., Lapa AJ. y Catapani WR. (2006). Assessing the therapeutic use of *Lafoensia pacari* St. Hil. extract (mangava-brava) in the eradication of *Helicobacter pylori*: double-blind randomized clinical trial. *Helicobacter.* 11(3):188-95.
48. De Leo M., De Tommasi N., Sanogo R., D'Angelo V., Germanò MP., Bisignano G. y Braca A. (2006). Triterpenoid saponins from *Pteleopsis suberosa* stem bark. *Phytochemistry.* 67(24):2623-9.
49. De Marino, S., Borbone N., Gala F., Zollo F., Fico G., Pagiotti R. y Iorizzi M. (2006). New constituents of sweet *Capsicum annuum* L. fruits and evaluation of their biological activity. *J Agric Food Chem.* 54(20):7508-16.
50. Debets-Ossenkopp YJ., Pot RG., van Westerloo DJ., Goodwin A., Vandenbroucke-Grauls CM., Berg DE., Hoffman PS. y Kusters JG. (1999). Insertion of mini-IS605 and deletion of adjacent sequences in the nitroreductase (*rdxA*) gene cause metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* NCTC11637. *Antimicrob Agents Chemother.* 43(11):2657-62.
51. Déciga-Campos M., Rivero-Cruz I., Arriaga-Alba M., Castañeda-Corral G., Ángeles-López GE., Navarrete A. y Mata R. (2006). Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in tradicional medicine. *J Ethnopharmacol.* 110(2):334-2.
52. Degnan AJ., Sonzogni WC. y Standridge JH. (2003). Development of a plating medium for selection of *Helicobacter pylori* from water samples. *Appl Environ Microbiol.* 69(5):2914-8.
53. Dehesa M., Larisch J., Dibildox M., Vega B., Di Silvio M., Rodríguez L., Camorlinga M., Almaguer I., Ramírez-Barba E. y Torres J. (1998). [Comparison of 2 schedules based on pantoprazole for eradication of *Helicobacter pylori* in patients with active duodenal ulcer]. *Rev Gastroenterol Mex.* 63(2):66-71.
54. Dewhirst FE., Fox JG. y On SL. (2000). Recommended minimal standards for describing new species of the genus *Helicobacter*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 50(6):2231-7.
55. Di Mario F., Cavallaro LG. y Scarpignato C. (2006). 'Rescue' therapies for the management of *Helicobacter pylori* infection. *Dig Dis.* 24(1-2):113-30.

56. Evans DJ. Jr., Evans DG., Engstrand L., y Graham DY. (1992). Urease associated heat shock protein of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.* 60(5):2125-7.
57. Falcão HS., Mariath IR., Diniz MF., Batista LM. y Barbosa-Filho JM. (2007). Plants of the American continent with antiulcer activity. *Phytomedicine.*15(1-2):132-46.
58. Falush D., Wirth T., Linz B., Pritchard JK., Stephens M., Kidd M., Blaser MJ., Graham DY., Vacher S., Pérez-Pérez GI., Yamaoka Y., Mégraud F., Otto K., Reichard U., Katzowitsch E., Wang X., Achtman M. y Suerbaum S. (2003). Treces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science.* 299(5612):1582-5.
59. Ferrero R. y Fox J. (2001). In vivo modeling of *Helicobacter*-associated gastrointestinal diseases in *Helicobacter pylori*. *Physiology and Genetics.* (Eds. Mobley, H.L.T., Mendz, G.L. y Hazell, S.L.) ASM Press Washington. pp 565-582.
60. Ford AC., Delaney BC., Forman D. y Moayyedi P. (2006). "Eradication therapy for peptic ulcer disease in *Helicobacter pylori* positive patients." *Cochrane Database Syst Rev* (2): CD003840.
61. Frenck RW. Jr. y Clements J. (2003). *Helicobacter* in the developing world. *Microbes Infect.* 5(8):705-13.
62. Funatogawa K., Hayashi S., Shimomura H., Yoshida T., Hatano T., Ito H. y Hiray Y. (2004). Antibacterial activity of hydrolyzable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *Microbiol Immunol.* 48(4):251-61.
63. Garrity GM., Bell JA. y Lilburn TG. (2004). *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology.* Segunda edición.
64. Gellerman JL., Walsh NJ., Werner NK. y Schlenk H. (1969). Antimicrobial effects of anacardic acids. *Can J Microbiol.* 15:1219-23.
65. Gerrits MM., van Vliet AH., Kuipers EJ. y Kusters JG. (2006). *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *Lancet Infect Dis.* 6(11):699-709.
66. Goel RK., Sairam K. y Rao CV. (2001). Role of gastric antioxidant and anti-*Helicobacter pylori* activities in antiulcerogenic activity of plantain banana (*Musa sapientum* var. paradisiaca). *Indian J Exp Biol.* 39(7):719-22.
67. González EE. y Delgado JN. (1962). Phytochemical investigation of *Amphipterygium adstringens*. *J Pharm Sci* 51(8): 786-90.

68. González EE., McKenna G. y Delgado JN. (1962). Anticancer Evaluation of *Amphipterygium adstringens*. J Pharm Sci. 51(9): 901-3.
69. González Robledo VA. (2007). Actividad anti-*Helicobacter pylori in Vitro* de extractos acuosos y metanólicos de 25 plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas. Tesis de licenciatura en biología. 100 pag.
70. Goodwin A., Kersulyte D., Sisson G., van Zanten SJ., Berg DE. y Hoffman PS. (1998). Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutations in a gene (*rdxA*) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase. Mol Microbiol. 28(2):383-93.
71. Goodwin CS. (1997). Antimicrobial treatment of *Helicobacter pylori* infection. Clin Infect Dis. 25(5)1023-6.
72. Graham DY. (1993). Treatment of peptic ulcers caused by *Helicobacter pylori*. N Engl J Med. 328(5):349-50.
73. Greenberg ER., Alberts DS. y Potter JD. (2005). Introduction: What should we do now about *H. pylori*?. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 14(8):1851-2.
74. Ha TJ. y Kubo I. (2005). Lipoxygenase inhibitory activity of anacardic acids. J Agric Food Chem. 53(11): 4350-4.
75. Hannula M. y Hänninen ML. (2007). Phylogenetic analysis of *Helicobacter* species based on partial *gyrB* gene sequences. Int J Syst Evol Microbiol. 57(8):444-9.
76. Haristoy X., Angioi-Duprez K., Duprez A. y Lozniewski A. (2003). Efficacy of sulforaphane in eradicating *Helicobacter pylori* in human gastric xenografts implanted in nude mice. Antimicrob Agen Chemother. 47(12):3982-4.
77. Hensel A., Deters AM., Muller G., Stark T., Wittschier N. y Hofmann T. (2007). Ocurrance of N-phenylpropenoyl-L-amino acid amides in different herbal drugs and their influence on human keratinocytes, on human liver cells and on adhesion of *Helicobacter pylori* to the human stomach. Planta Med. 73(2):142-50.
78. Himejima M. y Kubo I. (1991). Antibacterial agents from the cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) nut shell oil. J Agric Food Chem. 39(2):418-21.
79. Honda S., Fujioka T., Tokieda M., Satoh R., Nishizono A. y Nasu M. (1998). Development of *Helicobacter pylori*-induce gastric carcinoma in Mongolian gerbils. Cancer Res. 58(19):4255-9.

80. Ibrahim M., Khan A., Tiwari SK., Habeeb MA., Khaja MN. y Habibullah CM. (2006). Antimicrobial activity of *Sapindus mukorossi* and *Rheum emodi* extracts against *H. pylori*: *In vitro* and *in vivo* studies. *World J Gastroenterol.* 12(44):7136-42.
81. Iimuro M., Shibata H., Kawamori T., Matsumoto T., Arakawa T., Sugimur T. y Wakabayashi K. (2002). Suppressive effects of garlic extract on *Helicobacter pylori*-induced gastritis in Mongolian gerbils. *Cancer Lett.* 187(10):61-8.
82. Ikeno T., Ota H., Sugiyama A., Ishida K., Katsuyama T., Genta RM. y Kawasaki S. (1999). *Helicobacter pylori*-induced chronic active gastritis, intestinal metaplasia, and gastric ulcer in Mongolian gerbils. *Am J Pathol.* 154(3):951-60.
83. Itokawa H., Totsuka N., Nakahara K., Maezuru M., Takeya K., Kondo M., Inamatsu M. y Morita H. (1989). A quantitative structure-activity relationship for antitumor activity of long-chain phenols from *Ginkgo biloba* L. *Chem Pharm Bull.* 37(6):1619-21.
84. Jaime Aguilar HR. (2007). Actividad anti-*Helicobacter pylori* de extractos de plantas medicinales mexicanas, utilizadas para trastornos digestivos. Universidad Autónoma Metropolitana. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Tesis de licenciatura en biología experimental. 68 Pag.
85. Jeong JY., Mukhopadhyay AK., Dailidienne D., Wang Y., Velapatiño B., Gilman RH., Parkinson AJ., Nair GB., Wong BC., Lam SK., Mistry R., Segal I., Yuan Y., Gao H., Alarcon T., Brea ML., Ito Y., Kersulyte D., Lee HK., Gong Y., Goodwin A., Hoffman PS. y Berg DE. (2000). Sequential inactivation of *rdxA* (HP0954) and *frxA* (HP0642) nitroreductase genes causes moderate and high level metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol.* 182(18):5082-90.
86. Jones BD. y Mobley HL. (1987). Genetic and biochemical diversity of ureases of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella* species isolated from urinary tract infection. *Infect Immun.* 55(9):2198-203.
87. Kang J. y Blaser JM. (2006). Bacterial populations as perfect gases: genomic integrity and diversification tensions in *Helicobacter pylori*. *Nat Rev Microbiol.* 4(11):826-36.
88. Kanojia RM., Murria W., Bernstein J., Fernandez J., Foleno BD., Krause H., Lawrence L., Webb G. y Barret JF. (1999). 6-oxa isosteres of anacardic acids as potent inhibitors of bacterial histidine protein kinase (HPK)-mediated two-component regulatory systems. *Bioorg Med Chem Lett.* 9(20): 2947-52.



89. Kataoka M., Hirata K., Kunikata T., Ushio S., Iwaki K., Ohashi K., Ikeda M. y Kurimoto M. (2001). Antibacterial action of tryptanthrin and kaempferol, isolated from the indigo plant (*Polygonum tinctorium* Lour.), against *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils. *J Gastroenterol.* 36(1):5-9.
90. Keto Y., Takahashi S. y Okabe S. (1999). Healing of *Helicobacter pylori*-induced gastric ulcers in Mongolian gerbils: combined treatment with omeprazole and clarithromycin. *Dig Dis Sci.* 44(2):257-65.
91. Koga T., Inoue H., Ishii C., Okasaki Y., Domont H. y Utsui Y. (2002). Effect of plaunotol in combination with clarithromycin or amoxicillin on *Helicobacter pylori* *in vitro* and *in vivo*. *J Antimicrob Chemother.* 50(1):133-6.
92. Koga T., Kawada H., Utsui Y., Domon H., Ishii C. y Yashuda H. (1996). Bactericidal effect of plaunotol, a cytoprotective antiulcer agent, against *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother.* 38(3):387-97.
93. Kubo I., Komatsu S. y Ochi M. (1986). Molluscicides from the cashew *Anacardium occidentale* and their large-scale isolation. *J Agric Food Chem.* 34(6):970-3.
94. Kubo I., Muroi H. y Himejima M. (1993)a. Structure-antibacterial activity relationships of anacardic acids. *J Agric Food Chem.* 41(6):1016-9.
95. Kubo I., Ochi M., Vieira PC. y Komatsu S. (1993)b. Antitumor agents from the cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice. *J Agric Food Chem.* 41(6):1012-5.
96. Kubo J., Lee R. y Kubo I. (1999). Anti-*Helicobacter pylori* agents from the cashew apple. *J Agric Food Chem.* 47(2):533-7.
97. Kuipers EJ., Thijs JC. y Festen HP. (1995). The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 9(2):59-69.
98. Kusters JG., van Vliet AH. y Kuipers EJ. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infections. *Clin Microbiol Rev.* 19(3):449-90.
99. Kwon DH., Kim JJ., Lee M., Yamaoka Y., Kato M., Osato MS., El-Zaatari FA. y Graham DY. (2000). Isolation and characterization of tetracycline-resistant clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother.* 44(11):3203-5.
100. Lambert JR. (1996). Pharmacology of the gastric mucosa: a rational approach to *Helicobacter* polytherapy. *Gastroenterology.* 111(2):521-3.

101. Langenbert MI., Tygat GN., Schipper MEI., Rietra PJM. y Zanen HC. (1984). *Campylobacter*-like organisms in the stomach of patients and healthy individuals. *Lancet* 1(8390):1348-9.
102. Lee JH., Park EK., Uhm CS., Chung MS. y Kim KH. (2004). Inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric adenocarcinoma epithelial cells by acidic polysaccharides from *Artemisia capillaris* and *Panax ginseng*. *Planta Med.* 70(7):615-9.
103. Lee JH., Shim J.S., Lee J.S., Kim M.K., Chung M.S y Kim K.H. (2006)a. Pectin-like acidic polysaccharide from *Panax ginseng* with selective antiadhesive activity against pathogenic bacteria. *Carbohydr Res.* 341(9):1154-63.
104. Lee JH., Shim JS., Lee JS., Kim JK., Yang IS., Chung MS. Y Kim KH. (2006)b. Inhibition of pathogenic bacterial adhesion by acidic polysaccharide from Green Tea (*Camellia sinensis*). *J Agric Food Chem.* 54(23):8717-23.
105. Lee JU. y Kim O. (2006). Natural maternal transmission of *H. pylori* in Mongolian gerbils. *World J Gastroenterol.* 12(35):5663-7.
106. Lee KM., Yeo M., Choue JS., Jin JH., Park SJ., Cheong JY., Lee KJ., Kim JH. y Hahm KB. (2004). Protective mechanism of epigallocatechin-3-gallate against *Helicobacter pylori*-induced gastric epithelial cytotoxicity via the blockage of TLR-4 signaling. *Helicobacter.* 9(6):632-42.
107. Lengsfeld C., Deters A., Faller G. y Hensel A. (2004). High molecular weight polysaccharides from black currant seeds inhibit adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa. *Planta Med.* 70(7):620-6.
108. Lengsfeld C., Titgemeyer F., Faller G. y Hensel A. (2004). Glycosylated compounds from okra inhibit adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa. *J Agric Food Chem.* 52(6):1495-503.
109. Linz B., Balloux F., Moodley Y., Manica A., Liu H., Roumagnac P., Falush D., Stamer C., Prugnolle F., van der Merwe SW., Yamaoka Y., Graham DY., Pérez-Trallero E., Wadstrom T., Suerbaum S. y Achtman M. (2007). An African origin for the intimate association between human and *Helicobacter pylori*. *Nature.* 445(7130):915-8.
110. Liu Y. y Abreu P. (2006). Long chain alkyl and alkenyl phenols from the roots of *Ozoroa insignis*. *J Braz Chem Soc.* 17(3): 527-32.

111. Mabe K., Yamada M., Oguni I. y Takahashi T. (1999). *In vitro* and *in vivo* activities of tea catechins against *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother.* 43(7):1788-91.
112. Magdaleno R. (1987). *La farmacia del campo*. De Balsas editores S.A. Morelia Mich. México. 125pag.
113. Mahady GB., Pendland SL., Yung G. y Lu ZZ. (2002). Turmeric (*Curcuma longa*) and curcumin inhibit the growth of *Helicobacter pylori*, a group 1 carcinogen. *Anticancer Res.* 22(6c):4179-81.
114. Mahady GB. (2005). Medicinal plants for the prevention and treatment of bacterial infections. *Current Pharma Desing.* 11(19):2405-27.
115. Mahady GB., Bhamarapravati S., Adeniyi BA., Doyle B., Locklear T., Slover C. y Pendland SL. (2006). Traditional Thai medicines inhibit *Helicobacter pylori in vitro* and *in vivo*: support for ethnomedical use. *Ethnobotany Research and Applications.* 4:159-65.
116. Makino M., Motegi T. y Fujimoto Y. (2004). Tirucallane-type triterpenes from *Juliania adstringens*. *Phytochemistry.* 65(7): 891-6.
117. Marshall BJ. (2002). *Helicobacter pylori* 20 years on. *Clin Med.* 2(2):147-52.
118. Marshall BJ. y Goodwin C. (1987). Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. *Int J Syst Bacteriol.* 37(1):68.
119. Marshall BJ., Armstrong JA., McGeachie DB y Glancy RJ. (1985). Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med J Aust.* 142:436-9.
120. Marshall BJ. y Surveyor I. (1988). Carbon-14 urea breath test for the diagnosis of *Campylobacter pylori* associated gastritis. *J Nucl Med.* 29(1):11-16.
121. Marshall BJ. y Warren JR. (1984). Unidentified curved bacilli in stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet.* 1(8390):131-5.
122. Martin KW. y Ernst E. (2003). Herbal medicines for treatment of bacterial infections: a review of controlled clinical trials. *J Antimicrob Chemother.* 51:241-6.
123. Masuoka N. y Kubo I. (2004). Characterization of xanthine oxidase inhibition by anacardic acids. *Biochim Biophys Acta.* 1688(3):245-9.
124. Mata R., Calzada F., Navarrete A., del Rio F y Delgado G. (1991). Long-chain phenols from the bark of *Amphypterygium adstringens*. *J Ethnopharmacol.* 34(2-3):147-54.

125. Matsumara S., Shibata H., Ishikawa F., Yokokura T., Takahashi M., Sugimura T. y Wakabayashi K. (2003). Suppression of *Helicobacter pylori*-induced gastritis by green tea extract in Mongolian gerbils. *Biochem Biophys Res Commun.* 310(3):715-19.
126. Matsumoto T., Kawakubo M., Shiohara M., Kumagai T., Hidaka E., Yamauchi K., Oana K., Matsuzawa K., Ota H. y Kawakami Y. (2009). Phylogeny of a novel "*Helicobacter heilmannii*" organism from a Japanese patient with chronic gastritis based on DNA sequence analysis of 16S rRNA and urease genes. *J Microbiol.* 47(2):201-7.
127. McNulty CA. y Wise R. (1985). Rapid diagnosis of *Campylobacter*-associated gastritis. *Lancet.* 1(8443):1443-4.
128. Mégraud F. (2004). *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance and advances in testing. *Gut.* 53(9):1374-84.
129. Mégraud F. y Lehours P. (2007). *Helicobacter pylori* detection and susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev.* 20(2):280-322.
130. Miyata H., Yagi K., Kimura M., Kijima H., Isobe Y., Kaneda Y. y Akashi T. (1999). Distribution of *Helicobacter pylori* in a Mongolian Gerbils gastric ulcer model. *Lab Anim Sci.* 49(6):622-7.
131. Mobley HL., Island MD. y Hausinger RP. (1995). Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev.* 59(3):451-80.
132. Monteiro L., de Mascarel A., Sarrasqueta AM., Bergey B., Barberis C., Talby P., Roux D., Shouler L., Goldfain D., Lamouliatte H. y Mégraud F. (2001). Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection noninvasive methods compared to invasive methods and evaluation of two new test. *Am J Gastroenterol.* 96(2):353-8.
133. Moore R., Beckthold B., Wong S., Kureishi A. y Bryan L. (1995). Nucleotide sequence of the *gyrA* gene and characterization of ciprofloxacin-resistant mutants of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother.* 39(1):107-11.
134. Morais TC., Pinto NB., Carvalho KM., Rios JB., Ricardo NM, Trevisan MT., Rao VS. y Santos FA. (2010). Protective effect of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale*) on ethanol-induced gastric damage in mice. *Chem Biol Interact.* 183(1):264-9.
135. Murakami M., Ota H., Sugiyama A., Ishizone S., Maruta F., Akita N., Okimura Y., Kumagai T., Jo M. y Tokuyama T. (2005). Suppressive effect of rice extract on *Helicobacter pylori* infection in a Mongolian gerbil model. *J Gastroenterol.* 40(14):459-66.

136. Nakagawa S., Osaki T., Fujioka Y., Yamaguchi H. y Kamiya S. (2005). Long-term infection of Mongolian gerbils with *Helicobacter pylori* microbiological, histopathological, and serological analyses. Clin Diag Lab Immunol. 12(2):347-53.
137. Nakajima S., Fujita K., Inoue Y., Nishio M. y Seto Y. (2006). Effect of the folk remedy, Bainiku-ekisu, a concentrate of *Prunus mume* juice, on *Helicobacter pylori* infection in humans. Helicobacter. 11(6):589-91.
138. Navarrete CA. (1986). Estudio químico de plantas mexicanas usadas en medicina tradicional: constituyentes de *Chenopodium graveolens* Willd, *Chenopodium ambrosioides* L. y *Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas (Química Farmacéutica). Facultad de Química UNAM. 177 pag.
139. Navarrete CA., Avula B., Joshi VC. y Ji X. (2006). Quantitative determination of triterpenes from *Amphipterygium adstringens* by liquid chromatography and thin-layer chromatography and morphological analysis of cuachalalate preparations. J AOAC Int. 89(1):1-7.
140. Navarrete CA., Martínez-Uribe LS. y Reyes B. (1998). Gastroprotective activity of the stem bark *Amphipterygium adstringens* in rats. Phytother Res. 12(1):1-4.
141. Navarrete CA., Olivia I., Sánchez-Mendoza M., Arrieta J., Cruz-Antonio L. y Castañeda-Hernández G. (2005). Gastroprotection and effect of the simultaneous administration of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) of the pharmacokinetics and anti-inflammatory activity of diclofenac in rats. J Pharm Pharmacol. 57(12):1629-36.
142. Navarrete CA., Reyes TB., Silva MA., Sixtos AC., Islas PV. y Estrada LE. (1990). Evaluación farmacológica de la actividad antiulcerosa de *Amphipterygium adstringens* (Cuachalalate). Rev Mex Ciencias Farm. 21(3):28-32.
143. Ndip RN., Malange Tarkang AE., Mbullah SM., Luma HN., Malongue A., Ndip LM., Nyongbela K., Wirmum C. y Efang SM. (2007). In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of extracts of selected medicinal plants from North West Cameroon. J Ethnopharmacol. 114(3):452-7.
144. Nir Y., Potasman I., Stermer E., Tabak M. y Neeman I. (2000). Controlled trial of the effect of cinnamon extract on *Helicobacter pylori*. Helicobacter 5(2):94-7.
145. Nostro A., Cellini L., Di Bartolomeo S., Cannatelli M.A., Di Campli E., Procopio F., Grande R., Marcio L. y Alonzo V. (2006). Effects of combining extracts (from propolis or *Zingiber officinale*) with clarithromycin on *Helicobacter pylori*. Phytother Res. 20(3):187-90.

146. Nostro A., Cellini L., Di Bartolomeo S., Di Campli E., Grande R., Cannatelli MA., Marzio L. y Alonzo V. (2005). Antibacterial effect of plant extracts against *Helicobacter pylori*. *Phytother Res.* 19(3):198-202.
147. Occhialini A., Urdaci M., Doucet-Populaire F., Bébéar CM., Lamouliatte H. y Mégraud F. (1997). Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother.* 41(12):2724-8.
148. Ogura K., Maeda S., Nakao M., Watanabe T., Tada M., Kyutoku T., Yoshida H., Shiratori Y. y Omata M. (2000). Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil. *J Exp Med.* 192(11):1601-10.
149. Ohkusa T., Okayasu I., Miwa H., Ohtaka K., Endo S. y Sato N. (2003). *Helicobacter pylori* infection induces duodenitis and duodenal ulcer in Mongolian gerbils. *Gut.* 52(6):797-803.
150. Ohno T., Kita M., Yamaoka Y., Imamura S., Yamamoto T., Mitsufuji S., Kodama T., Kashima K. y Imanishi J. (2003). Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter.* 8(3):207-15.
151. Okamoto T., Yoshiyama H., Nakazawa T., Park ID., Chang MW., Yanai H., Okita K. y Shira M. (2002). A change in PBP1 is involved in amoxicillin resistance of clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother.* 50(6):849-56.
152. Olivera OAG., Soto HM., Martínez VM., Terrazas ST. y Solares AF. (1999). Phytochemical study of cuachalalate (*Amphiptherygium adstringens*, Schiede ex Schlecht). *J Ethnopharmacol.* 68:109-13.
153. O'Mahony R., Al-Khtheeri H., Weerasekera D., Fernando N., Vaira D., Holton J. y Basset C. (2005). Bactericidal and anti-adhesive properties of culinary and medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol.* 11(47):7499-507.
154. Opekun AR., Yeh CW., Opekun JL. y Graham DY. (2005). *In vivo* tests of natural therapy, Tibetan yogurt or fresh broccoli, for *Helicobacter pylori* infection. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 27(5):327-9.
155. Otken CC. y Scott CE. (1984). Feeding characteristics of Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Lab Anim Sci.* 34(2):181-4.
156. Otsuka T., Tsukamoto T., Tanaka H., Inada K., Utsunomiya H., Mizoshita T., Kumagai T., Katsuyama T., Miki K. y Tatematsu M. (2005). Suppressive effects of fruit-juice concentrate

- of *Prunus mume* Sieb. et Zucc. (Japanese apricot, Ume) on *Helicobacter pylori*-induced glandular stomach lesions in Mongolian gerbils. *Asian Pac J Cancer Prev.* 6(3):337-41.
157. Oviedo-Chávez I., Ramírez-Apan T. y Martínez-Vázquez M. (2005). Cytotoxic activity on nitric oxide production of tirucallane-type triterpenes. *J Pharm Pharmacol.* 57(9):1087-91.
  158. Oviedo-Chávez I., Ramírez-Apan T., Soto-Hernández M. y Martínez-Vázquez M. (2004). Principles of the bark *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity. *Phytomedicine.* 11(5):436-45.
  159. Paramashivappa R., Kumar PP., Vithayathil PJ. y Rao AS. (2001). Novel method for isolation of major phenolic constituents from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut shell liquid. *J Agric Chem.* 49(5):2548-51.
  160. Parente F., Cucino C., Bianchi Porro G. (2003). Treatment options for patients with *Helicobacter pylori* infection resistant to one or more eradication attempts. *Dig Liver Dis.* 35(8):523-8.
  161. Park S., Yeo M., Jin J., Lee K., Jung J., Choue R., Cho S y Hahm K. (2005). Rescue of *Helicobacter pylori*-induced cytotoxicity by red ginseng. *Dig Dis Sci.* 50(7):1218-27.
  162. Park BS., Lee H.K., Lee SE., Piao XL., Takeoka GR., Wong RY., Ahn YJ. y Kim JH. (2006). Antibacterial activity of *Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC (Taheebo) against *Helicobacter pylori*. *J Ethnopharmacol.* 105(1-2):255-62.
  163. Pennington T. y Sarukhán J. (1998). Manual para la identificación de campo de los principales árboles tropicales de México, 2nd ed. INIF-SAG, FAO, 413 pag.
  164. Pérez-Pérez G., Olivares A., Cover T. y Blaser MJ. (1992). Characteristics of *Helicobacter pylori* variants selected for urease deficiency. *Infect Immun.* 60(9):3658-63.
  165. Reyes García B. (2008). Estudio de la actividad anti-*Helicobacter pylori* de dos plantas asociadas a *Amphipterygium adstringens*. Tesis de licenciatura en biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 91pag.
  166. Rivero-Cruz I., Acevedo L., Guerrero JA., Martínez S., Bye R., Pereda-Miranda R., Franzblau S., Timmerman BN. y Mata R. (2005). Antimycobacterial agents from selected Mexican medicinal plants. *J Pharm and Pharmacol.* 57(9):1117-26.
  167. Rocco A. y Nardone G. (2007). Diet, *H. pylori* infection and gastric cancer: evidence and controversies. *World J Gastroenterol.* 13(21):2901-12.

168. Rózalski A., Sidorczyk Z. y Kotelko K. (1997). Potencial virulence factors of *Proteus bacilli*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 61(1):65-89.
169. Sawada Y., Kuroda Y., Sashio H., Yamamoto N., Tonokatsu Y., Sakagami T., Fukuda Y., Shimoyama T., Nishigami T. y Uematsu K. (1998). Pathological changes in glandular stomach of *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbil model. *J Gastroenterol.* 33(10):22-5.
170. Scarpignato C. (2004). Towards the ideal regimen for *Helicobacter pylori* eradication: the search continues. *Dig Liver Dis.* 36(4):234-7.
171. Schultz DJ., Olsen C., Cobbs GA., Stolowich NJ. y Parrot MM. (2006). Bioactivity of anacardic acid against Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) larvae. *J Agric Food Chem.* 54(20):7522-9.
172. Shibata H., Kimura TI., Nagaoka M., Hashimoto S., Sawada H., Ueyama S. y Yokokura T. (1999). Inhibitory effect of *Cladosiphon fucoïdan* on the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric cells. *J Nutr Sci Vitaminol.* 45(3):325-36.
173. Shmuelly H., Burger O., Neeman I., Yahav J., Samra Z., Niv Y., Sharon N., Weiss E., Athamna A., Tabak M. y Ofek I. (2004). Susceptibility of *Helicobacter pylori* isolates to the antiadhesion activity of a high-molecular-weight constituent of cranberry. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 50(4):231-5.
174. Sisson G., Jeong JY., Goodwin A., Bryden L., Rossler N., Lim-Morrison S. (2001). Metronidazole activation is mutagenic and causes DNA fragmentation in *Helicobacter pylori* and in *Escherichia coli* containing a cloned *H. pylori rdxA+* (nitroreductase) gene. *J Bacteriol.* 182(18):5091-6.
175. Smith S., Oyedeji K., Arigbabu A., Atimomo C. y Coker A. (2001). High amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori* isolated from gastritis and peptic ulcer patients in western Nigeria. *J Gastroenterol.* 36(1):67-8.
176. Souza MC., Selhorst-Beserra AM., Martins DC., Villa-Real V., Nunes dos Santos A., Satyanaratana-Rao V., Matos da Silva R. y de Oliveira-Martins DT. (2009). *In vitro* and *in vivo* anti-*H. pylori* activity of *Calophyllum brasiliense* Camb. *J Ethnopharmacol.* 123(3):452-8.



177. Spiegelhalder C., Gerstenecker B., Kersten A., Schiltz, E. y Kist M. (1993). Purification of *Helicobacter pylori* superoxide dismutase and cloning and sequencing of the gene. *Infect Immun.* 61(12):5315-25.
178. Stege PW., Davicino RC., Vega AE., Casali YA., Correa S. y Micalizzi B. (2006). Antimicrobial activity of aqueous extracts of *Larrea divaricata* Cav (jarilla) against *Helicobacter pylori*. *Phytomed.* 13(9-10):724-7.
179. Suerbaum S. y Josenhans C. (2007). *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nat Rev Microbiol.* 5(6):441-51.
180. Sullivan JT., Richards CS., Lloyd HA. y Krishna G. (1982). Anacardic acid: mulluscicide in cashew nut shell liquid. *Planta Med.* 44(3):175-7.
181. Sun YK., Monstein HJ., Nilsson LE., Petersson F. y Borch K. (2003). Profiling and identification of eubacteria in the stomach of Mongolian gerbils with and without *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 8(2):149-57.
182. Suzuki H., Nishizawa T. y Hibi T. (2010). *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Future Microbiol.* 5(4):639-46.
183. Takabayashi F., Harada N., Yamada M., Murohisa B. y Oguni I. (2004). Inhibitory effect of green tea catechins in combination with sucralfate on *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *J Gastroenterol.* 39(10):61-3.
184. Takagi A., Koga Y., Aiba Y., Kabir AM., Watanabe S., Ohta-Tada U., Osaki T., Kamiya S. y Miwa T. (2000). Plaunotol suppresses interleukin-8 secretion induced by *Helicobacter pylori*: therapeutic effect of plaunotol on *H. pylori* infection. *J Gastroenterol Hepatol.* 15(4):374-80.
185. Takeda K., Utsunomiya H., Kakiuchi S., Okuno Y., Oda K., Inada K., Tsutsumi Y., Tanaka T. y Kakudo K. (2007). *Citrus auraptene* reduces *Helicobacter pylori* colonization of glandular stomach lesions in Mongolian gerbils. *J Oleo Sci.* 56(5):253-60.
186. Tan MP., Kaparakis M., Galic M., Pedersen J., Pearse M., Wijburg LC., Janssen PH. y Strugnell RA. (2007). Chronic *Helicobacter pylori* infection does not significantly alter the microbiota of the murine stomach. *Appl Environ Microbiol.* 73(3):1010-3.
187. Testerman TL., McGee DJ. y Mobley HL. (2001). *Helicobacter pylori* growth and urease detection in the chemically defined medium Ham's F-12 nutrient mixture. *J Clin Microbiol.* 39(11):3842-50.

188. Thijs JC., van Zwet AA., Thijs WJ., Oey HB., Karrenbeld A., Stellaard F., Luijt DS. Meyer BC. y Kleibeuker JH. (1996). Diagnostic tests for *Helicobacter pylori*: a prospective evaluation of their accuracy, without selecting a single test as the gold Standard. *Am J Gastroenterol.* 91(10):2125-9.
189. Tominaga K., Higuchi K., Hamasaki N., Hamaguchi M., Takashima T., Tanigawa T., Watanabe T., Fujiwara Y., Tezuka Y., Nahaoka T., Kadota S., Ishii E., Kobayashi K. y Arakawa T. (2002). *In vivo* action of novel alkyl methyl quinolone alkaloids against *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother* 50(4):547-52.
190. Torres J. (2000). *Helicobacter pylori*: ¿comensal, patógeno o todo lo contrario?. *Enf Inec Microbiol.* 20:1-2.
191. Torres J., Leal-Herrera Y., Pérez-Pérez G., Gómez A., Carmolingo-Ponce M., Cedillo-Rivera R., Tapia-Conyer R. y Muñoz O. (1998). A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in México. *J Infect Dis.* 178(4):1089-94.
192. Torres J., López L., Lazcano E., Camorlinga M., Flores L. y Muñoz O. (2005). Trends in *Helicobacter pylori* and gastric cancer in México. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 14(8):1874-7.
193. Toyomizu M., Okamoto K., Ishibashi T., Chen Z. y Nakatsu T. (2000). Uncoupling effect of anacardic acids from cashew nut shell oil on oxidative phosphorylation of rat liver mitochondria. *Life Sci.* 66(3):229-34.
194. Trevisan MT., Pfundstein B., Haubner R., Würtele G., Spiegelhalter B., Bartsch H. y Owen RW. (2006). Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. *Food Chem Toxicol.* 44(2):188-97.
195. Trieber CA. y Taylor DE. (2002). Mutations in the 16s rRNA genes of *Helicobacter pylori* mediate resistance to tetracycline. *J Bacteriol.* 184(8):2113-40.
196. Tsugane y Sasazuki. (2007). Diet and the risk of gastric cancer: review of epidemiological evidence. *Gastric Cancer.* 10(2):75-83.
197. Tyman JHP. (2001). Chemistry and biochemistry of anacardic acids. *Recent Research Developments in lipids,* 5, 125-45.
198. Tyman JHP., Johnson RA., Muir M. y Rokhgar R. (1989). The extraction of natural cashew nut-shell liquid from the cashew nut (*Anacardium occidentale*). *JAOCS.* 66(4):553-7.

199. van Amsterdam K., van Vliet AH., Kusters JG. y van der Ende A. (2006). Of microbe and man: determinants of *Helicobacter pylori*-related diseases. *FEMS Microbiol Rev.* 30(1):131-56.
200. Van Doorn LJ., Debets-Ossenkopp YJ., Marais A., Sanna R., Mégraud F., Kusters JG. y Quint WG. (1999). Rapid detection, by PCR and reverse hybridization, of mutations in the *Helicobacter pylori* 23S rRNA gene, associated with macrolide resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 43(7):1779-82.
201. Versalovic J., Shortridge D., Kibler K., Griffy M., Beyer J. y Flamm R. (1996). Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother.* 40(2): 477-80.
202. Wang D., Girard TJ., Kasten TP., LaChance RM., Miller-Wideman MA. y Durley RC. (1998). Inhibitory activity of unsaturated fatty acids and anacardic acids toward soluble tissue factor-factor VIIa complex. *J Nat Prod.* 61(11):1352-5.
203. Watanabe T., Tada M., Nagai H., Sasaki S. y Nakao M. (1998). *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in Mongolian gerbils. *Gastroenterology.* 115(3):642-8.
204. Worthington JM. y Fulghum RS. (1988). Cecal and fecal bacterial flora of the Mongolian gerbil and the chinchilla. *Appl Environ Microbiol.* 54(5):1210-5.
205. Xiang Z., Censini S., Bayeli P., Telford J., Figura N., Rappuoli R. y Covacci A. (1995). Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating toxin. *Infect Immun.* 63(1):94-8.
206. Yamagiwa Y., Mera H., Tokushima K., Ohta S. y Himejima M. (1993). Structure-antibacterial activity relationships of anacardic acids. *J Agric Food Chem.* 41:1016-19.
207. Yan X., Kita M., Minami M., Yamamoto T., Kuriyama H., Ohno T., Iwakura Y. y Imanishi J. (2002). Antibacterial effect of Kampo herbal formulation Hochu-ekki-to (Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang) on *Helicobacter pylori* infection in mice. *Microbiol Immunol.* 46(7):475-82.
208. Yanata A., Fahey JW. Fukumoto A., Nakayama M., Inoue S., Zhang S., Tauchi M., Suzuki H., Hyodo I. y Yamamoto M. (2009). Dietary sulforaphane-rich broccoli sprouts reduce colonization and attenuate gastritis in *Helicobacter pylori*-infected mice and humans. *Cancer Prev Res.* 2(4):353-60.

209. Yee YK. y Koo MW. (2000). Anti-*Helicobacter pylori* activity of Chinese tea: in vitro study. *Aliment Pharmacol Ther.* 14(5):635-8.
210. Yee YK., Koo MW. y Szeto ML. (2002). Chinese tea consumption and lower risk of *Helicobacter* infection. *J Gastroenterol Hepatol.* 17(5):552-5.
211. Zhang HM., Wakisada N., Maeda N. y Yamamoto T. (1997). Vitamin c inhibits the growth of a bacterial risk factor for gastric carcinoma: *Helicobacter pylori*. *Cancer.* 15(80):1897-1903.

## 7.- GLOSARIO:

*Carcinógeno tipo I*: clasificación de la Agencia Internacional para el Estudio del Cáncer que refiere a un carcinógeno definitivo.

*Gastritis aguda*: procesos inflamatorios en la mucosa y submucosa del estómago, caracterizado por la presencia de polimorfos nucleares dentro de las faveolas y lámina propia. Puede ser de tipo *erosiva* cuando se pierden regiones del epitelio gástrico superficial.

*Gastritis crónica*: inflamación del estómago caracterizada por la presencia simultánea de infiltrado de linfocitos, células plasmáticas y polimorfos nucleares neutrofilicos. Se define como activa cuando se presentan folículos linfoides en la submucosa.

*Linfoma tipo MALT*: es un cáncer en el sistema linfático y se presenta como un tumor sólido de células linfoides.

*Metaplasia intestinal*: consiste en el cambio de células propias del estómago (epitelio cúbico simple) por células presentes en el intestino (epitelio cilíndrico simple con células caliciformes y microvellosidades).

*Población panmítica*: Poblaciones donde la estructura clonal se pierde por la frecuente recombinación.

*Púrpura trombocitopénica idiopática*: Es una enfermedad que se caracteriza por una falta de plaquetas, por lo cual ocurren hemorragias en piel y otros órganos. Los órganos inmunitarios producen anticuerpos contra las plaquetas.

*Reflujo gastroesofágico*: es el reflujo del ácido gástrico hacia la región baja del esófago.

*Síndrome o esófago de Barret*: estado precanceroso caracterizado por la presencia de metaplasias en la región baja del esófago, en el que el epitelio escamoso es remplazado por epitelio de tipo glandular compuesto de células columnares.

*Úlcera péptica*: es el proceso de erosión de la mucosa y que puede sobrepasar hasta la muscular. De acuerdo a la región donde se localiza el daño puede ser *gástrica* o *duodenal*.

## 8. -PUBLICACIONES DURANTE EL PERIODO DEL DOCTORADO.

El proyecto desarrollado en esta tesis parte de una inquietud que tuve en el primer semestre de la carrera de biología, la cual consistía en determinar un posible efecto inhibitor del crecimiento de *H. pylori* de la corteza de “cuachalalate” y la raíz de “cancerina” en un modelo animal. Se inició en el laboratorio del Dr. Heliodoro Celis Sandoval en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y posteriormente en 2006 se continuó a mi ingreso al posgrado en el laboratorio de la Facultad de Medicina de la UNAM, bajo la tutoría de la Dra. Irma Romero Álvarez.

Con el desarrollo de la metodología *in vitro* investigue el efecto inhibitor del crecimiento de *H. pylori* de la corteza de *A. adstringens*, sin embargo, otro de los objetivos que inicialmente eran parte del proyecto con el que ingrese al doctorado, consistía en evaluar dicha actividad en plantas que se utilizaran en la medicina tradicional mexicana de una manera global (“screening”). Por lo que a la par y con ayuda de dos estudiantes de licenciatura, también analicé la actividad de plantas utilizadas para tratar “desordenes gastrointestinales” y cuyo trabajo finalizó en la obtención de sus tesis de licenciatura y la publicación de un artículo que anexo <sup>34,69,84</sup>. Así también, con un tercer estudiante realice la comparación de actividad inhibitor del crecimiento de *H. pylori* de dos plantas asociadas al *A. adstringens*, que es la “chupandilla” (*Cyrtocarpa procera*) y el “cuachalalate blanco” (*Guaiacum coulteri*), trabajo con el cual también obtuvo su tesis de licenciatura<sup>164</sup>.

Por otra parte, anexo algunas de varias publicaciones periodísticas cuya información está basada en el boletín UNAM-DGCS-768/7diciembre2008, pero de manera personal los títulos parecen tendenciosos en señalar que de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, la corteza de “cuachalalate” “alivia o cura” patologías producidas por *H. pylori*. Cabe señalar que aún faltan muchos estudios para concluir esto, además de que la actividad de los compuestos descritos hasta el momento únicamente se ha determinado *in vitro* y no están presentes en un extracto acuoso, que es la manera tradicional como la gente ingiere la planta. Para el caso de la nota del diario Milenio, la estructura química del compuesto que describe no corresponde a ninguno de los que encontramos activos y para el caso del subtítulo de la gaceta de la UNAM que refiere a “úlceras pépticas y duodenales”, aclarar que en el término úlcera péptica se engloba a la gástrica y a la duodenal.



## Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*

Israel Castillo-Juárez<sup>a</sup>, Fausto Rivero-Cruz<sup>b</sup>, Heliodoro Celis<sup>c</sup>, Irma Romero<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., C.P. 04510, Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., C.P. 04510, Mexico

<sup>c</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., C.P. 04510, Mexico

Received 14 March 2007; received in revised form 22 June 2007; accepted 23 July 2007

Available online 27 July 2007

### Abstract

*Amphipterygium adstringens* (Schldl.) Standl. (Anacardiaceae) is widely used in traditional Mexican medicine for the treatment of gastritis and ulcers. In this work, we studied the anti-*Helicobacter pylori* activity of its bark, this Gram-negative bacterium is considered the major etiological agent of chronic active gastritis and peptic ulcer disease, and it is linked to gastric carcinoma. From a bio-guided assay of the fractions obtained from a continuous Soxhlet extraction of the bark, we identified that petroleum ether fraction had significant antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. From this fraction, we isolated an anacardic acids mixture and three known triterpenes: masticadienonic acid; 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid; 3-*epi*-oleanolic; as well as the sterol  $\beta$ -sitosterol. Only the anacardic acids mixture exhibits a potent dose-dependent antibacterial activity (MIC = 10  $\mu$ g/ml in broth cultures). It is enriched in saturated alkyl phenolic acids (C<sub>15:0</sub>, C<sub>16:0</sub>, C<sub>17:0</sub>, C<sub>19:0</sub>) which represents a novel source of these compounds with potent anti-*Helicobacter pylori* activity. The promising use of anacardic acids and *Amphipterygium adstringens* bark in the development of an integral treatment of *Helicobacter pylori* diseases is discussed.

© 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** *Helicobacter pylori*; Anacardic acids; Antibacterial activity; *Amphipterygium adstringens*; Long-chain phenols; Anacardiaceae

### 1. Introduction

*Helicobacter pylori* is a spiral-shaped Gram-negative bacterium that colonizes the stomach in more than 80% of the population in developing countries, and under 40% in industrialized countries. *Helicobacter pylori* infection is now recognized as the major etiological agent of chronic active gastritis and peptic ulcer disease, and it is linked to gastric carcinoma. It is estimated that *Helicobacter pylori*-positive patients have a 10–20% risk of developing ulcer disease and 1–2% risk of developing distal gastric cancer (Kusters et al., 2006).

According to international guidelines, first-line therapy for treating *Helicobacter pylori* infection consists of proton pumping inhibitor or ranitidine bismuth citrate with any two antibiotics of amoxicillin, clarithromycin or metronida-

zole given for 7–14 days. However, approximately 20% of patients fail to obtain eradication; thus a second-line therapy, a quadruple regimen composed by tetracycline, metronidazole (or others depending of the initial treatment), bismuth salts and a proton pump inhibitor is recommended in these cases. An indiscriminate use of antibiotics to eradicate *Helicobacter pylori* also from healthy carriers, sometimes leads to severe problems with bacterial resistance against these important drugs. Moreover, the emergence of any significant side adverse effect caused by antibacterial drugs may result in need to stop eradication therapy even if the aim is not achieved. Therefore, there is an intense demand for a therapeutic regimen having the same or higher beneficial properties of antibiotics but with reduced side effects (Di Mario et al., 2006).

The ethnopharmacological approach has been an important source to find new anti-*Helicobacter pylori* agents. Crude drugs and isolated compounds from plants used in herbal traditional medicines of different parts of the world have been tested for anti-*Helicobacter pylori* activity *in vitro*, in animal models,

\* Corresponding author. Tel.: +52 55 5623 2511; fax: +52 55 5616 2419.  
E-mail address: iromero@ifc.unam.mx (I. Romero).

as well as in clinical studies, as possible sources for alternative eradication therapies (Borrelli and Izzo, 2000; Kawase and Motohashi, 2004; Mahady, 2005). With this concern in mind, we have searched for new antibacterial agents from the Anacardiaceae plant *Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Standl. This traditional medicinal tree is known in Mexico as “cuachalalate”, “cuachalala”, “matixeran”, “volador” or in Nahuatl language “cuachalalatl”, and its bark decoction is commonly used for the treatment of numerous conditions such as cholelithiasis, fresh wounds, fevers, gastritis, gastric ulcers, gastrointestinal cancer, gum diseases and various inflammatory conditions (Olivera Ortega et al., 1999).

Previous phytochemical investigation on *Amphipterygium adstringens* bark resulted in the isolation and identification of several triterpenoids (Soriano-García et al., 1987; Watson et al., 1987; Navarrete et al., 1989; Makino et al., 2004); long-chain phenols (Navarrete et al., 1989; Mata et al., 1991); and, the 3-dodecyl-1,8-dihydroxy-2-naphtic acid (Rivero-Cruz et al., 2005). Pharmacological studies have revealed an hypcholesterolaemic effect of an hexane extract of the bark (Mata et al., 1991). A methanolic extract was found to have a gastroprotective effect (Navarrete et al., 1998), and the isolated triterpenes: 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid, 3-*epi*-oleanolic acid, and the sterol,  $\beta$ -sitosterol were identified as the active principles (Arrieta et al., 2003). The aqueous and hexane extracts of the stem-bark showed anti-inflammatory activity with masticadienonic and 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acids as active compounds (Oviedo-Chavez et al., 2004). A methanol extract showed moderate trypanocidal activity against *Trypanosoma cruzi* (Abe et al., 2005). Finally, several tirucallane-type triterpenes were found to exhibit moderate growth inhibitory activity against leukemia cells (L-1210) (Makino et al., 2004).

In spite of the large quantity of studies about the compounds of *Amphipterygium adstringens*, there are no reports concerning their anti-*Helicobacter pylori* activity. In this work we evaluate the *in vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of *Amphipterygium adstringens* bark.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material

The bark of *Amphipterygium adstringens* was obtained from a Mexican gathering center for medicinal plants located in Jolalpan (Puebla). A voucher specimen was deposited in the National Herbarium (MEXU) Institute of Biology at the Universidad Nacional Autónoma de México, in Mexico City, Mexico.

### 2.2. Extraction and fractionation

Thirty gram of powdered bark was successively extracted with increased polarity solvents in a Soxhlet extraction apparatus. The obtained yields were: petroleum ether 3.05%; anhydrous ether 0.79%; chloroform 0.37%; anhydrous ethanol 7.50%; 70% ethanol 13.57%; and, water 7.13%. Each sample was dissolved in water or DMSO according to its polarity and tested for antimicrobial activity.

Petroleum ether extract: 1.0 kg of powdered bark was exhaustively extracted by maceration at room temperature with 2.5 l petroleum ether. After filtration, the extract was concentrated under vacuum to yield 27 g of a dark green oily residue. The extract was subjected to a silica gel (0.5 kg) vacuum column chromatography and eluted with a gradient mixture of hexane–ethyl acetate (1:0  $\rightarrow$  0:1, 1 l per fraction) to give seven pooled fractions (F1–F7). A crystalline solid precipitated from F4 and was identified as 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid. Fractions F2 and F3 were separately rechromatographed in a silica gel column using a gradient mixture of hexane–ethyl acetate. These processes yielded an anacardic acids mixture from F2; and, masticadienonic acid, 3-*epi*-oleanolic acid and  $\beta$ -sitosterol from F3. All the structures were established by comparing spectral and physical data with those reported previously in the literature (Mata et al., 1991), and by direct comparison with authentic samples.

### 2.3. Preparation of derivatives of the alkyl phenolic acids for GC/MS

A sample of anacardic acids mixture (10 mg) was reacted with a freshly distilled diazomethane ether solution for 24 h at room temperature to yield 11.1 mg of the methylated mixture.

### 2.4. Gas chromatography/mass spectrometry

Samples were injected to an Agilent 6890N gas chromatograph with an automatic liquid sampler Agilent 7683B coupled to a LECO Pegasus 4D mass spectrometer. The column was an HP-5MS 10 m  $\times$  180  $\mu$ m, film thickness 0.18  $\mu$ m. Helium at 1 ml/min was used as the carrier gas. The column oven was temperature-programmed from 180 to 280  $^{\circ}$ C at 8  $^{\circ}$ C/min. The injector and detector temperatures were both 280  $^{\circ}$ C; electron energy 70 eV. Masses scanned 33–600 a.u. The constituents of the anacardic acids mixture were identified by matching their 70 eV mass spectra with compound libraries.

### 2.5. Bacterial strains and culture conditions

*Helicobacter pylori* standard strain ATCC 43504 was used in this study. Stock cultures were stored at  $-70^{\circ}$ C in Brucella broth with 10% fetal bovine serum (GIBCO BRL) and 10% glycerol. *Helicobacter pylori* was grown on Casman agar (DIFCO) plates, 0.2%  $\beta$ -cyclodextrin, and 10  $\mu$ g/ml vancomycin for 3–5 days at 37  $^{\circ}$ C under microaerophilic conditions (10% CO<sub>2</sub>). Liquid cultures were performed in 3 ml of Brucella broth (DIFCO) plus 0.2%  $\beta$ -cyclodextrin and 10  $\mu$ g/ml vancomycin, maintained under gentle shaking (150 rpm) for the time of the experiment in the aforescribed CO<sub>2</sub> enriched atmosphere. The strains were identified by Gram staining morphology and biochemically tested (catalase, urease, and oxidase positive). *Escherichia coli* K12 was also used in this study; Luria–Bertani broth (LB) and LB agar plates were used for its growth and for the inhibition experiments.



### 2.6. Minimal inhibition concentration and bactericidal activity

MIC was determined in broth cultures by using an *in vitro* killing assay. Different concentrations of the compounds to be tested (in a maximal volume of 20  $\mu$ l DMSO), were added to 3 ml of *Helicobacter pylori* broth culture at the beginning of the exponential growth phase ( $\sim 10^7$  CFU/ml).  $\Delta A_{660}$  was calculated after maintaining the tubes for around 14 h at 37 °C in a microaerophilic atmosphere with gentle shaking.  $\Delta A_{660}$  was used to calculate the growth percentage of inhibition with respect to a control that was grown only with DMSO. In order to determine the bactericidal action, samples (100  $\mu$ l) were taken at various growing times for viable-cell counting. Serial 10-fold dilutions were made with Brucella broth and plated onto Casman agar prepared as described before. Viability was measured by the plate colony count method after 5–10 days of incubation. Also, samples for morphological study were taken at different growing times.

The final DMSO concentration in the assay never exceeded 0.66% (v/v) and did not have any effect in the growth at this concentration.

### 2.7. Cytotoxic test

Cellular toxicity was assessed by MTT method in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) as described before (Vega et al., 1999). Briefly, PBMC were harvested and inoculated into 96-well microtiter plates at  $10^5$  cells/well, with various concentrations of anacardic acids mixture dissolved in DMSO (0.2% total volume). After incubation for 3, 24 and 48 h, 20  $\mu$ l of 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, 5 mg/ml in PBS) was added for 3 h at 37 °C. The formazan dye was solubilized adding 100  $\mu$ l DMSO to each well followed by gentle shaking and, the absorbance was determined on an ELISA-plate reader at 545 nm. The absorption obtained in DMSO treated cultures was considered as 100% viability.

### 2.8. Transmission electron microscopy

Cells were fixed at 4 °C with 3% glutaraldehyde for 2 h. The samples were rinsed with PBS buffer; post-fixed for 2 h at 4 °C using a 1% OsO<sub>4</sub> solution in PBS; then gradually dehydrated with ethanol series; and finally embedded in Epon resin. Ultra-thin sections (90 nm) were mounted on copper grids and stained with 2% uranyl acetate followed by 2% lead citrate and observed under a JEOL 1200CXII electron microscope at an accelerating voltage of 60 kV.

## 3. Results

*Amphipterygium adstringens* is a highly valued plant used in traditional Mexican medicine for the treatment of gastritis and ulcer. From a bio-guided assay of the fractions obtained from a continuous Soxhlet extraction of the bark, it was found that petroleum ether fraction exhibited antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* (100 and 90% inhibition at 160 and

Table 1  
Effect of anacardic acids mixture isolated from *Amphipterygium adstringens* against *Helicobacter pylori*

Tested compounds	$\mu$ g/ml	Percentage growth inhibition
Anacardic acids	2	48
10	109	
16	112	
Metronidazole <sup>a</sup>	300	90
Amoxicillin <sup>a</sup>	0.1	90

Percentage of inhibition was estimated with respect to a control that was incubated only with the solvent (DMSO).

<sup>a</sup> Reference antibiotics.

16  $\mu$ g/ml, respectively). Column chromatography separation of this active fraction resulted in the isolation and identification of 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid, masticadienonic acid, 3-*epi*-oleanolic acid,  $\beta$ -sitosterol, and a long-chain phenolic acids (anacardic acids) mixture. The GC/MS analysis of the methylated anacardic acids mixture revealed that the phenolic acids mixture was composed of four long-chain phenolic acids possessing C<sub>15</sub> (46.8%), C<sub>16</sub> (7.2%), C<sub>17</sub> (29.9%), and C<sub>19</sub> (7.5%) side saturated chains as well as one C<sub>19</sub> monounsaturated side chain phenol (8.6%). In all cases, the mass spectra of the methyl derivatives were consistent with those previously reported in the literature (Mata et al., 1991).

### 3.1. Antibacterial activity of anacardic acids and other isolated compounds from *Amphipterygium adstringens*

The effect of anacardic acids mixture, masticadienonic acid, 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid, and 3-*epi*-oleanolic acid (200, 100, 50, 12.5 and 6.25  $\mu$ g/ml) on the growth of *Helicobacter pylori* ATCC 43504 was determined using broth cultures. The effect of  $\beta$ -sitosterol was not tested because of its insolubility in culture media. Only anacardic acids completely inhibited the growth of the bacteria; 3-*epi*-oleanolic acid inhibits 70% with 50  $\mu$ g/ml, and the other terpenoids did not inhibit its growth (data not shown). It should be noted that all the terpenoids at the

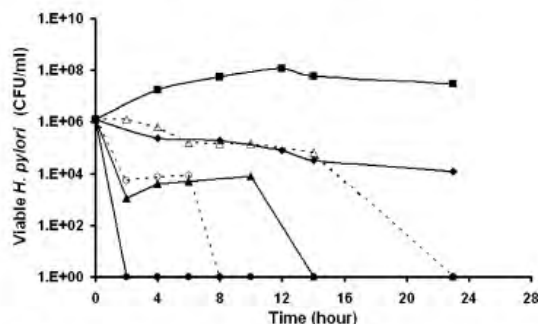


Fig. 1. Bactericidal activity of anacardic acids mixture against *Helicobacter pylori*. Broth cultures of *Helicobacter pylori* ATCC 43504 were exposed to anacardic acids mixture at concentrations of 0 (■), 12.5 (◆), 25 (▲), and 50 (●)  $\mu$ g/ml. Culture samples were taken at the indicated times, and viability was measured by plate colony count technique. Reference antibiotics: metronidazole (○), 250  $\mu$ g/ml and amoxicillin (△), 0.1  $\mu$ g/ml.

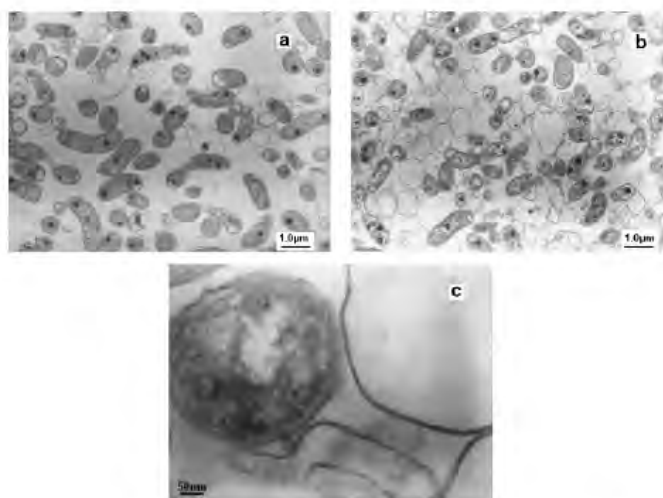


Fig. 2. Transmission electron micrograph of *Helicobacter pylori* culture exposed to anacardic acids mixture. (a) Typically curved bacteria in untreated controls are seen. (b) Destroyed and empty envelopes predominated after treatment for 8 h with 30 µg/ml anacardic acids mixture. (c) Magnification of the last condition.

highest tested concentration have solubility problems evidenced as culture turbidity. The MIC<sub>100</sub> determined for anacardic acids mixture by this method is 10 µg/ml; this antibacterial activity is comparable with the one observed in the assay for reference antibiotics metronidazole and amoxicillin (Table 1).

The killing kinetic of anacardic acids mixture is summarized in Fig. 1. The bactericidal effect is time and dose-dependent; the number of viable *Helicobacter pylori* cells decreased by exposure to anacardic acids mixture reaching total inhibition in 15 h with 25 µg/ml, and in only 2 h with 50 µg/ml. Fig. 1 also shows the kinetic for metronidazole and amoxicillin; it is interesting that with the first reference antibiotic, the maximal bactericidal effect was reached in 8 h with 250 µg/ml, and in 23 h with 0.1 µg/ml of amoxicillin.

It is remarkable that none of the tested compounds in this study revealed significant antibacterial activity against *Escherichia coli* (data not shown).

The results of morphological analysis by transmission electron microscopy showed that most of the untreated control cells appeared as slightly curved bacilli, and the cytoplasm was rel-

atively homogeneous (Fig. 2a). Cultures exposed to anacardic acids mixture at 30 µg/ml for 8 h revealed smaller degenerative cells surrounded by discontinuous or broken membranes; and, in some of them, the cytoplasm appeared to be separated from the cell wall. A considerable number of empty round membranes is also observed (Fig. 2b and c). These observations are consistent with viability data and with the decrease observed in the culture absorption.

In order to determine if anacardic acids mixture could exert a toxic effect over human peripheral blood mononuclear cells (PBMC), we treated resting human PBMC for 3, 24, and 48 h with eight concentrations of the mixture (0.01–50 µg/ml). The assay revealed that anacardic acids mixture did not affect the viability of PBMC at 3 and 24 h of incubation; however, a slightly (6.3–12.8%) not dose-dependent effect was observed at 48 h (Table 2).

#### 4. Discussion

In this study, we investigated the *in vitro* antibacterial activity of various compounds isolated from *Amphipterygium adstringens* bark against *Helicobacter pylori*. Among them, anacardic acids mixture was the most effective in inhibiting bacterial growth, having a MIC of 10 µg/ml in broth cultures. This value is in the inhibitory range of reference antibiotics used to test antimicrobial susceptibility and for the eradication of *Helicobacter pylori*.

Anacardic acids have been previously isolated from various parts of *Anacardium occidentale* (Tyman, 1979), and subsequently their diverse biological activities have also been reported. For example, their molluscicidal (Sullivan et al., 1982), antibacterial (Gellerman et al., 1969; Kubo et al., 1993a; Kubo et al., 1999), and cytotoxic (Kubo et al., 1993b) activities have been described. Anacardic acids are also known to inhibit vari-

Table 2  
Viability of PBMC treated for 48 h with anacardic acids mixture

Anacardic acids mixture (µg/ml)	A <sub>545</sub>	% Viability
0	1.27 ± 0.08	100.00
0.01	1.18 ± 0.07	92.96
0.05	1.18 ± 0.01	92.59
0.1	1.11 ± 0.06*	87.49
0.5	1.15 ± 0.03*	90.24
1.0	1.19 ± 0.07	93.74
5.0	1.11 ± 0.04*	87.02
10.0	1.17 ± 0.02*	91.73
50.0	1.17 ± 0.01*	92.28

Absorbance results are expressed as the mean ± S.E., n = 3. \*P < 0.05 compared with untreated cells (Student's *t*-test).

ous enzymes such as prostaglandin endoperoxide synthase and lipoxygenase (Grazzini et al., 1991),  $\alpha$ -glucosidase, invertase and aldose reductase (Toyomizu et al., 1993), urease (Kubo et al., 1999), and xanthine oxidase (Trevisan et al., 2006).

It has been particularly demonstrated that some anacardic acids exhibited a potent antibacterial activity against Gram-positive bacteria (MIC 0.78–100  $\mu\text{g/ml}$  and in general, increasing the MIC as decreased the double bonds in the chain) (Kubo et al., 1993a). Furthermore, the bactericidal activity of cashew apple ( $C_{15:3}$ ), ( $C_{15:2}$ ), ( $C_{15:1}$ ), anacardic acids, and the synthetic analogues ( $C_{15:0}$ ) and ( $C_{12:0}$ ) against the Gram-negative *Helicobacter pylori* have also been studied. The long-chain phenols with  $C_{15:3}$ ,  $C_{15:2}$  and  $C_{12:0}$  were the most potent with MICs of 200  $\mu\text{g/ml}$  when tested through the agar dilution method, and with MIBs of 800  $\mu\text{g/ml}$  for  $C_{15:3}$  and  $C_{12:0}$ . While the salicylic acid was inactive (Kubo et al., 1999).

Anacardic acids with a saturated alkyl side chain seem to be relatively rare and to occur only in traces and mixed with unsaturated analogues (Spencer et al., 1980). Nevertheless, it has been reported the presence of anacardic acids with  $C_{15:0}$ ,  $C_{16:0}$ ,  $C_{17:0}$ ,  $C_{19:0}$  and one unsaturated, 6[15'(Z)-nonadecenyl]-salicylic acid, ( $C_{19:1}$ ) in *Amphipterygium adstringens* (Mata et al., 1991).

The anacardic acid mixture utilized in this work, enriched in saturated alkyl phenolic acids, represents a novel source with potent anti-*Helicobacter pylori* activity. The length of the side chains of three of these compounds ( $C_{16:0}$ ,  $C_{17:0}$ ,  $C_{19:0}$ ) present in the mixture isolated from *Amphipterygium adstringens* is larger and different than the ones of anacardic acids previously tested for antimicrobial activity (Gellerman et al., 1969; Kubo et al., 1993a; Kubo et al., 1999); therefore, the specific effect of the length chain should be further explored.

Kubo et al. (1999) observed that when the MIC was determined through the agar dilution method, the two saturated side chain anacardic acids,  $C_{15:0}$  and  $C_{12:0}$ , were hardly soluble in the water-based medium; consequently, an exact value could not be established unequivocally. As these compounds are organic solvent soluble, we think that the best way to test their antibacterial activity is through the broth method as it is easier for them to reach the membranes rather than with the agar dilution one, where they are dissolved in the agar matrix first, making their diffusion to the membranes less effective. In fact, when we tested the *Amphipterygium adstringens* anacardic acids inhibition through the agar dilution method recommended by NCCLS the compound made aggregates in the plate. Hence, the broth method could be useful to test this and other hydrophobic compounds.

The lipophilic nature of these compounds suggests an interaction with cell membranes. Anacardic acids are salicylic acid derivatives with a linear long alkyl chain and the salicylic acid moiety gives them some degree of hydrophilicity. It has been demonstrated that four anacardic acids ( $C_{15:0}$ ,  $C_{15:1}$ ,  $C_{15:2}$  and  $C_{15:3}$ ) may act as protonophores, and when the carboxyl group in anacardic acid was removed, the uncoupling activity dramatically decreased (Toyomizu et al., 2000). Nevertheless, this uncoupler action may not be the only mechanism of action since *Escherichia coli* and other Gram-negative bacteria are not con-

siderably affected by them (Kubo et al., 1993a). However, the lipid composition of *Helicobacter pylori* has special features (Hirai et al., 1995) and may be specifically susceptible to this kind of compounds.

The cytotoxic assay reveals that *Amphipterygium adstringens* anacardic acids mixture did not affect significantly the viability of PBMC. It was reported that the mixture of anacardic acid methyl esters was not toxic to brine shrimp *Artemia salina* (LC > 1000 ppm) (Navarrete et al., 1989). The cytotoxic and genotoxic effects of *Amphipterygium adstringens*  $C_{19:0}$  anacardic acid and its methyl ester have been recently studied. The first, at 10 mg/kg for 24 h, lowers the ratios of polychromatic erythrocytes to normochromatic erythrocytes in mice; the methyl ester showed no cytotoxic activity. The administration of either of the compounds did not lead to chromosome damage at the evaluated doses (Acevedo et al., 2006). It is interesting to note that in the case of *Anacardium occidentale*, the apple anacardic acids content is 1.1 g/kg (Trevisan et al., 2006); people regularly consume directly the fruit, as well as, different processed products derived from this plant, thus, it would seem that their toxicity may not be serious or that it has been overlooked. Nevertheless, the type of anacardic acids of *Anacardium occidentale* is different to that of *Amphipterygium adstringens*.

Conventional therapies suppress not only *Helicobacter pylori* but also the intestinal bacterial flora which produces side-effects as abdominal pain and diarrhoea. In regards to this, since anacardic acids seem to have a restricted antibacterial spectrum (Gellerman et al., 1969; Kubo et al., 1993a), these compounds arise as an option in the management of the bacterial infection.

On the other hand, *Amphipterygium adstringens* bark appears as a candidate for the development of an integral treatment of *Helicobacter pylori* diseases because, as it has been demonstrated in this work, it possesses an antibacterial capacity due to anacardic acids in addition to a gastroprotective and anti-inflammatory activity due to its terpenoids as has also been previously proved (Olivera Ortega et al., 1999; Arrieta et al., 2003; Oviedo-Chavez et al., 2004).

In conclusion, anacardic acids derived from *Amphipterygium adstringens* have an antibacterial activity against *Helicobacter pylori*. These compounds together with proton pump inhibitors could be potentially used as a therapy against *Helicobacter pylori*. Nevertheless, it is necessary to carry out further *in vivo* experiments to determine the therapeutic value of these compounds. The precise antibacterial action of these compounds remains to be elucidated.

#### Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. Rachel Mata for her critical feedback and generous support. The authors also thank Dr. Libia Vega Loyo, Sección Externa de Toxicología, CINVESTAV-IPN, for her help in the cytotoxicity assay; as well as M.S. Edelmira Linares, and Ph.D. Robert Bye, Jardín Botánico, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, for the taxonomical identification of the plant; M.S. Silvia Escobedo for technical assistance; and, Rodolfo Paredes for assistance in the electron microscope studies.

## References

- Abe, F., Nagafuji, S., Okawa, M., Kinjo, J., Akahane, H., Ogura, T., Martínez-Alfaro, M.A., Reyes-Chilpa, R., 2005. Trypanocidal constituents in plants 5. Evaluation of some Mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in the seeds of *Persea americana*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 28, 1314–1317.
- Acevedo, H.R., Rojas, M.D., Arceo, S.D., Soto Hernandez, M., Martínez Vázquez, M., Terrazas, T., Del Toro, G.V., 2006. Effect of 6-nonadecyl salicylic acid and its methyl ester on the induction of micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutation Research* 609, 43–46.
- Arrieta, J., Benitez, J., Flores, E., Castillo, C., Navarrete, A., 2003. Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. *Planta Medica* 69, 905–909.
- Borrelli, F., Izzo, A.A., 2000. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytotherapy Research* 14, 581–591.
- Di Mario, F., Cavallaro, L.G., Scarpignato, C., 2006. 'Rescue' therapies for the management of *Helicobacter pylori* infection. *Digestive Diseases* 24, 113–130.
- Gellerman, J.L., Wash, N.J., Wemer, N.K., Schlenk, H.A., 1969. Antimicrobial effects of anacardic acids. *Canadian Journal of Microbiology* 15, 1219–1223.
- Grazzini, R., Hesk, D., Heining, E., Hildenbrandt, G., Reddy, C.C., Cox-Foster, D., Medford, J., Craig, R., Mumma, R.O., 1991. Inhibition of lipoxygenase and prostaglandin endoperoxide synthase by anacardic acids. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 176, 775–780.
- Hirai, Y., Haque, M., Yoshida, T., Yokota, K., Yasuda, T., Oguma, K., 1995. Unique cholesteryl glucosides in *Helicobacter pylori*: composition and structural analysis. *Journal of Bacteriology* 177, 5327–5333.
- Kawase, M., Motohashi, N., 2004. Plant-derived leading compounds for eradication of *Helicobacter pylori*. *Current Medicinal Chemistry—Anti-Infective Agents* 3, 89–100.
- Kubo, I., Muroi, H., Himejima, M., 1993a. Structure-antibacterial activity relationships of anacardic acids. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 41, 1016–1019.
- Kubo, I., Ochi, M., Vieira, P., Komatsu, S., 1993b. Antitumor agents from the cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 41, 1012–1015.
- Kubo, J., Lee, J.R., Kubo, I., 1999. Anti-*Helicobacter pylori* agents from the cashew apple. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 47, 533–537.
- Kusters, J.G., van Vliet, A.H., Kuipers, E.J., 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology Review* 19, 449–490.
- Mahady, G.B., 2005. Medicinal plants for the prevention and treatment of bacterial infections. *Current Pharmaceutical Design* 11, 2405–2427.
- Makino, M., Motegi, T., Fujimoto, Y., 2004. Tirucallane-type triterpenes from *Juliania adstringens*. *Phytochemistry* 65, 891–896.
- Mata, R., Calzada, F., Navarrete, A., del Rio, F., Delgado, G., 1991. Long-chain phenols from the bark of *Amphipterygium adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology* 34, 147–154.
- Navarrete, A., Mata, R., Delgado, G., 1989. Alkylanacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. *Planta Medica* 55, 579.
- Navarrete, A., Martínez-Urbe, L.S., Reyes, B., 1998. Gastroprotective activity of the stem bark of *Amphipterygium adstringens* in rats. *Phytotherapy Research* 12, 1–4.
- Olivera Ortega, A.G., Soto Hernandez, M., Martínez Vázquez, M., Terrazas Salgado, T., Solares Arenas, F., 1999. Phytochemical study of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*, Schiede ex Schlecht). *Journal of Ethnopharmacology* 68, 109–113.
- Oviedo-Chavez, I., Ramírez-Apan, T., Soto-Hernandez, M., Martínez-Vázquez, M., 2004. Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity. *Phytomedicine* 11, 436–445.
- Rivero-Cruz, I., Acevedo, L., Guerrero, J.A., Martínez, S., Bye, R., Pereda-Miranda, R., Franzblau, S., Timmermann, B.N., Mata, R., 2005. Antimycobacterial agents from selected Mexican medicinal plants. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 57, 1117–1126.
- Soriano-García, M., Toscano, R.A., Ortiz, B., Navarrete, A., Sanchez-Obreron, R., Barrios, H., Yuste, F., 1987. Structure and stereochemistry of the methyl ester of (5 $\alpha$ ,13 $\alpha$ ,14 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,20S,24Z)-3-oxolanosta-7,24-dien-26-oic acid (masticadienonic acid). *Acta Crystallographica C* 43, 990–992.
- Spencer, G.F., Tjarks, L.W., Kleiman, R., 1980. Alkyl and phenylalkyl anacardic acids from *Knema elegans* seed oil. *Journal of Natural Products* 43, 724–730.
- Sullivan, J.T., Richards, C.S., Lloyd, H.A., Krishna, G., 1982. Anacardic acid: molluscicide in cashew nut shell liquid. *Planta Medica* 44, 175–177.
- Toyomizu, M., Sugiyama, S., Jin, R.L., Nakatsu, T., 1993.  $\alpha$ -Glucosidase and aldose reductase inhibitors: constituents of cashew, *Anacardium occidentale*, nut shell liquids. *Phytotherapy Research* 7, 252–254.
- Toyomizu, M., Okamoto, K., Ishibashi, T., Chen, Z., Nakatsu, T., 2000. Uncoupling effect of anacardic acids from cashew nut shell oil on oxidative phosphorylation of rat liver mitochondria. *Life Sciences* 66, 229–234.
- Trevisan, M.T., Pfundstein, B., Haubner, R., Wurtele, G., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., Owen, R.W., 2006. Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. *Food and Chemical Toxicology* 44, 188–197.
- Tyman, J.H.P., 1979. Nonisoprenoid long chain phenols. *Chemical Society Reviews* 8, 499–537.
- Vega, L., Ostrosky-Wegman, P., Fortoul, T.I., Diaz, C., Madrid, V., Saavedra, R., 1999. Sodium arsenite reduces proliferation of human activated T-cells by inhibition of the secretion of interleukin-2. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 21, 203–220.
- Watson, W.H., Domínguez, X.A., Vázquez, G., García, S., 1987. Cuachalalate acid, a new triterpene from *Amphipterygium adstringens*. *Revista Latinoamericana de Química* 18, 89–90.



Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Microbiological Methods

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jmicmeth](http://www.elsevier.com/locate/jmicmeth)Rapid paper disk test for identification of *Helicobacter pylori* in mixed cultures of gerbil gastric homogenates

Israel Castillo-Juarez, Adrian Rangel-Vega, Irma Romero\*

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

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 24 March 2010

Accepted 6 July 2010

Available online 16 July 2010

## Keywords:

Gerbil

*Helicobacter pylori*

Identification

Oxidase

Test

Urease

## ABSTRACT

A method denominated rapid paper disk test (RPDT) was developed to identify *H. pylori* colonies in complex cultures obtained from gerbil gastric homogenates. Identification is based on a characteristic reaction pattern (RP) for *H. pylori* colonies given by the combination of the urease–oxidase activities on a paper disk. Compared to the RPs obtained from gerbil's intestinal tract isolated bacteria, *H. pylori* RP is completely distinguishable, even from those of bacteria that share one or both activities as are *Aerococcus urinae*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus brevis*, *Corynebacterium pseudogenitalium*, and *Staphylococcus simulans*, as well as from those produced by collection strains *Proteus vulgaris* and *Pseudomonas aeruginosa*. This method allows the practical quantification of *H. pylori* colonies in highly contaminated plates. RPDT has the following advantages over other methodologies that use indicators in the medium: it employs two of the three routinely used *H. pylori* biochemical identification tests, the reagents do not interfere with bacterial viability, there are no restrictions in relation to the medium used, and it is a simple, fast, and low-cost method.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

*Helicobacter pylori* is a Gram negative bacteria which colonizes the human stomach and is the main cause of active chronic gastritis and peptic ulcer; besides, it has also been catalogued as a type I carcinogen by the International Agency for Research on Cancer (Kusters et al., 2006). There are many *H. pylori* identification methods that can be used in humans; some of them (culture, histology, PCR, and urea breath test (UBT), for instance) can quantify the number of bacteria in the stomach (Mégraud and Lehours, 2007).

Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) is considered an ideal animal model to establish *H. pylori* infection, because it is possible to reproduce in it the main human pathologies associated to the bacteria such as gastritis, duodenal and gastric ulcer, atrophy, intestinal metaplasia and cancer. Colonization can be produced with diverse strains, and in general infection keeps constant and spontaneous eradication does not occur (Hirayama et al., 1996; 1999; Honda et al., 1998; Ikeno et al., 1999; Keto et al., 1999; Kodama et al., 2005; Nakagawa et al., 2005; Ogura et al., 2000; Ohkusa et al., 2003; Sawada et al., 1998; Sun et al., 2003; Watanabe et al., 1998; Yan et al., 2004). Until now, the most common methods used to evaluate stomach infections are histopathological examination and culture. In culture, three standard biochemical tests (urease, oxidase and catalase), Gram

stain, sensitivity to cephalothin and nalidixic acid, or PCR technique are usually used for *H. pylori* identification (Lee and Kim, 2006; Otsuka et al., 2005; Watanabe et al., 1998; Yan et al., 2004). Quantification of the number of colonizing organisms in the stomach is mainly performed by plate count, and more recently by quantitative real-time PCR (Nakagawa et al., 2005; Osaki et al., 2006; Otsuka et al., 2005; Takeda et al., 2007); with the first method *H. pylori* colony identification is tedious and delayed and, in spite of the use of selective antibiotics, contaminations appear (Kuo et al., 2008).

The Belo Horizonte medium (BHM) (Queiroz et al., 1987) as well as others with the same principle (Lee and Kim, 2006; Mabe et al., 1999; Mine et al., 2005; Nakagawa et al., 2005; Sun et al., 2003), have been used to make the plate count of gerbil stomach samples easier. In these media, 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) is reduced to insoluble red formazan complexes by growing *H. pylori*, giving the colonies a golden color. Although Queiroz et al. (1987) stated that this appearance is characteristic of the then-called *Campylobacter pylori* when compared with other control bacteria, currently there is not a clear knowledge explaining the phenomenon and it is necessary to apply other tests to confirm bacterial identity (Lee and Kim, 2006; Queiroz et al., 1987; Sun et al., 2003). Furthermore, there are no studies that corroborate its selectivity and sensitivity in gerbil samples.

Addition of urease reaction reagents to culture media has been proposed for bacterial identification in diverse samples (Cellini et al., 1992; Degnan et al., 2003; Testerman et al., 2001). The limitations of this method are that it is restricted to translucent media, and the reaction disseminates in large zones making colony quantification difficult.

\* Corresponding author. Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, National Autonomous University of Mexico, Mexico, 04510, D.F., Mexico. Tel.: +52 55 56232511; fax: +52 55 56162419.

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

In this study, a new method denominated rapid paper disk test (RPDT) was developed to identify *H. pylori* colonies in mixed cultures obtained from gerbil stomachs. The method is based on two of the three routine biochemical tests used for bacteria identification. Applied to the plate count this methodology allows, in a practical and simple way, to know the number of viable *H. pylori* in gerbil's stomachs.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial growth conditions

*Helicobacter pylori* ATCC 43504, *Proteus vulgaris* ATCC 6808 (a "strong urease" producer), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (a "weak urease" producer), as well as the isolated gerbil's gut flora were grown in different culture media, depending on the particular experimental design, as is specified later in this section. All cultures were incubated at 37 °C in a microaerophilic atmosphere (10% CO<sub>2</sub>) in an NUAIRE incubator (NU-3500).

### 2.2. Mongolian gerbils

Conventional non-monitored male Mongolian gerbils (4–8 weeks old) from UNAM's Faculty of Science Biotery were used. A maximum of 6 animals per cage were housed on sawdust bedding. Tap water and pelleted diet were provided *ad libitum*. All animal experiments were performed according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Mexican Council for Animal Care, and the protocols were approved by the institutional Animal Care Committee.

### 2.3. Rapid paper disk test (RPDT) for *H. pylori* (patent application in process)

#### 2.3.1. Colony transfer and urease activity

To determine the urease activity, 0.02% bromothymol blue (Merck), 0.05% phenol red (Sigma) and 6% urea (ultra pure Gibco BRL) were dissolved in distilled water and adjusted to pH 4.5 with HCl. With a thin layer chromatography reagent sprayer the solution was applied onto filter paper disks cut for Petri dishes (Whatman No. 1) and dried for 2 min. In order to transfer the colonies and test their urease activity, a disk was carefully placed on the surface of a previously grown plate and it was immediately removed. Urease positive activity was detected as a diffuse pink halo around the colonies.

#### 2.3.2. Oxidase activity

A fresh 0.25% tetramethyl-*p*-phenylenediamine (TMPD) (Sigma) distilled water solution was applied with the sprayer onto a new paper disk. Before it dried, the disk was placed upon the first disk in which the urease test was performed. After 10–20 s, enough for the oxidase reaction to take place, the disk was separated. The test is considered positive if the colony in the urease disk turns to a violet color. The reaction pattern (RP) for positive urease–oxidase *H. pylori* colonies is a violet center surrounded by a pink halo.

### 2.4. Analysis of gerbil's microbiota using the RPDT

#### 2.4.1. Isolation of gerbil's microbiota

Two gerbils were sacrificed and samples of the forestomach, forestomach bolus, stomach, stomach bolus, 2 cm of duodenum, and 40 mg of feces collected from the colon, were taken. The samples were homogenized in 2 ml of Brucella broth without antibiotics and two-fold dilutions were made (except for the duodenum and feces samples, in which the dilutions were 1:5 and 1:10, respectively). Then, 0.1 ml of the dilutions was spread onto Mueller Hinton agar plates (DIFCO) containing 5% defibrinated sheep blood (MicroLab).

After seven days of incubation the isolates were preliminary selected according to their Gram stain and colony morphology.

#### 2.4.2. Reaction pattern of gerbil isolates and identification

The selected colonies were dotted on Mueller Hinton agar plates (DIFCO) containing 5% defibrinated sheep blood (MicroLab), and incubated for 12–24 h. RPDT was performed in order to determine the RP. Urease positive bacteria were classified considering their bacterial group, based on the Cowal and Steel criteria, and were identified by the BBL Crystal™ GP-ID miniaturized method. In the case of non-bacterial colonies the API-20 C AUX miniaturized method was used.

### 2.5. Quantification of *H. pylori* seeded in gerbil stomach samples using the RPDT

Five 24 h fasten gerbils, were sacrificed and their stomachs were separately homogenized with 2 ml of Brucella broth medium containing different *H. pylori* ATCC 43504 concentrations (10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup> CFU and a negative control without bacteria). Serial dilutions (1:10) were made and 0.1 ml of each were spread by triplicate on different media plates: Mueller Hinton, 5% defibrinated sheep blood (MH-b); Casman, 2% β-cyclodextrin (Ca-c), or Casman, 5% defibrinated sheep blood (Ca-b); all of them were supplemented with 7.5 mg/l amphotericin B, 3500 U polymyxin B sulfate, 10 mg/l vancomycin, and 5 mg/l trimethoprim. After 5 days of incubation under the previously described microaerophilic conditions, the CFU/stomach was determined by RPDT.

## 3. Results

### 3.1. Urease activity of microbiota and bacteria isolated from gerbil samples

*H. pylori* colonies show a characteristic RP with RPDT: a violet center surrounded by a pink halo, due to the combination of urease–oxidase activities. To determine if the method was able to distinguish between *H. pylori* colonies from other bacterial colonies sharing these activities in gerbil gastric homogenates, isolation of digestive tract microbiota and analysis with the RPDT were performed.

A total of 107 isolates were obtained, with the following proportions: 23% from stomach, 20% from stomach bolus, 26.3% from forestomach, 3.6% from forestomach bolus, 7.2% from duodenum and 19% from feces. The microscopic analysis revealed that 38.5% of the total isolates corresponded to a yeast, lately identified as *Candida guilliermondii*. This microorganism was found in all samples but was predominant in those of stomach (48%), stomach bolus (52%) and duodenum (57%).

The remaining 61.5% corresponded to bacterial cells; a selection that left 57 isolates was made based on similarities among colonies and bacterial morphology. The isolates were divided in 4 groups depending on their growing time: 18, 24, 48 and 120 h. Analysis by RPDT showed that only 8 of them were urease positive and were identified as *Corynebacterium pseudogenitalium* (isolates 58, 61, and 63), *Aerococcus urinae*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus brevis* and *Staphylococcus simulans* (isolates 10 and 60) (Table 1). *H. pylori* ATCC 43504 presented a similar RP to other *H. pylori* strains such as the ATCC 49503 and three human gastric isolates (data not shown), and was clearly distinguishable from the 8 non-*H. pylori* positive-urease isolated (Fig. 1, Table 1). We also compared the *H. pylori* RP with the one produced by the two collection strains *Proteus vulgaris* and *Pseudomonas aeruginosa* which are considered high-, and low-urease producing strains, respectively. In the case of *P. vulgaris* which developed a big colony in 24 h, RP was characterized by a well delimited pink colony surrounded by a less intense pink halo. These features, in addition to the lack of oxidase activity, made the *P. vulgaris* RP completely different from that of *H. pylori* (Fig. 1 i vs k). On the other hand, *P. aeruginosa* grew in 18 h and the

**Table 1**  
Urease and oxidase activity by RPDT of gerbil isolates and collection strains.

Isolates <sup>a</sup> and collection strains [h] <sup>b</sup>	Confidence interval	Sample	Urease	Oxidase
<i>Aerococcus urinae</i> [48]	0.79	Stomach	+ <sup>c</sup>	+ <sup>e</sup>
<i>Bacillus brevis</i> [18]	0.87	Stomach bolus	+ <sup>c</sup>	–
<i>Bacillus sphaericus</i> [18]	0.99	Stomach	+ <sup>c</sup>	–
<i>Corynebacterium pseudogenitalium</i> 63 [48]	0.88	Feces	+ <sup>c</sup>	+ <sup>e</sup>
<i>Corynebacterium pseudogenitalium</i> 61 [18]	0.88	Feces	+ <sup>c</sup>	+
<i>Corynebacterium pseudogenitalium</i> 58 [18]	0.79	Feces	+ <sup>c</sup>	+
<i>Staphylococcus simulans</i> 10 [18]	0.90	Feces	+ <sup>c</sup>	+ <sup>e</sup>
<i>Staphylococcus simulans</i> 60 [18]	0.88	Feces	+ <sup>c</sup>	+ <sup>e</sup>
<i>Proteus vulgaris</i> [24]	nd	ATCC 6808	+ <sup>d</sup>	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> [18]	nd	ATCC 27853	+ <sup>c</sup>	+
<i>Helicobacter pylori</i> [120]	nd	ATCC 43504	+	+

<sup>a</sup> Identified with miniaturized method BBL Crystal™ GP-ID.

<sup>b</sup> Colony growing time at which TPD was performed.

<sup>c</sup> The colony turns pink, but there is no halo formation.

<sup>d</sup> Pink halo appears slowly and less intense than *H. pylori* halo.

<sup>e</sup> Colony did not turn violet on urease disk, but it did on oxidase disk (0.25% TMDP).

observed RP showed only a pink colony with a defined violet edge due to oxidase activity (Fig. 1j).

### 3.2. RPDT distinguishes *H. pylori* colonies in complex cultures of gerbil stomachs

To determine the RPDT sensitivity in contaminated cultures, different numbers of *H. pylori* were seeded in gerbil stomach samples to simulate colonization. The results showed that RPDT was able to detect at least 100 CFU and quantify very closely the seeded bacteria independently from the culture medium used (Fig. 2). Nevertheless, with the MH agar, the amount of bacteria recovered was smaller, especially with low-seeded CFUs (actually, in one of the triplicates we were unable to find any bacteria, which increased the dispersion value). It is important to note that the method could detect the presence of a low number of *H. pylori* colonies in culture plates with a high degree of contaminants (Fig. 3). Negative controls with no *H. pylori* seeded did not show any similar *H. pylori*'s RP.

## 4. Discussion

The reported differential media based on urease activity for *H. pylori* identification, present several disadvantages: first, media have to be made with bases and supplements that do interfere with the plate transparency; second, identification is based on a single activity (urease) which could be shared with other non-*H. pylori* bacteria; and third, the reaction produced could spread over a large zone in the plate, making colony quantification difficult (Ding et al., 2001). In addition to these factors, we found that phenol red and urea incorporation to Casman-cyclodextrin plates completely inhibits bacterial growth (data not shown).

The new test presented in this work, RPDT, for *H. pylori* identification, is based on the RP obtained for the urease–oxidase activities on a paper disk. This procedure has many advantages: it employs two of the three routinely recognized identification tests; reagents do not interfere with bacterial viability since the test is applied once the organisms have grown, and does not require any special type of medium.

In order to test the efficiency of RPDT to identify *H. pylori* colonies in complex cultures, we isolated gerbil digestive tract microbiota. Non-monitored animals were used to obtain as many different colonies as possible. *C. guilliermondii* was the most abundant microorganism registered; this result differs from previous studies in which most microbiota found in gerbil was *Lactobacillus* (Sun et al.,

2003; Tan et al., 2007; Worthington and Fulghum, 1988). This difference could be due to the conditions in which isolation was carried out, as well as the animal's origin; nevertheless it is important to point out that *C. guilliermondii* was not positive with RPDT.

Isolation of urease positive bacteria such as *Bacillus subtilis*, *Acinetobacter* spp, *Pseudomonas* spp, *Corynebacterium* spp, *Enterococcus* spp and *Staphylococcus* spp has been reported in gerbil stomach samples (Sun et al., 2003). We isolated *A. urinae*, and *B. sphaericus* from the stomach samples; from the bolus, *B. brevis*, and from feces *C. pseudogenitalium*, and *S. simulans* (Table 1).

Of the three identified *C. pseudogenitalium* isolates, number 63 did not match with isolates number 61 and 68 in the colony morphology, growing time, and the RP presented. In spite of the good confidence interval (0.88) for identification obtained (Table 1), these differences suggest that it could be a different species.

On analyzing the RPDT urease reaction, we found that only *H. pylori* and *P. vulgaris* showed halo formation, while the other studied bacteria (*A. urinae*, *B. sphaericus*, *B. brevis*, *C. pseudogenitalium*, *S. simulans*, and *P. aeruginosa*) just exhibited pink colonies (Fig. 1). Species of *Proteus* have been catalogued as “strong urease” producers, characteristic that distinguishes them from other Enterobacteriaceae bacteria (Bradley and Mobley, 1987; Rózsalski et al., 1997). Urease halo formation in *P. vulgaris* requires a big size colony (Fig. 1i), achieved in only 24 h, while in the case of *H. pylori*, the colony requires at least 4 days and halo formation is immediate. These observations indicate that colony growing time and its morphology play an important role in the RP characteristics that would allow better *H. pylori* identification.

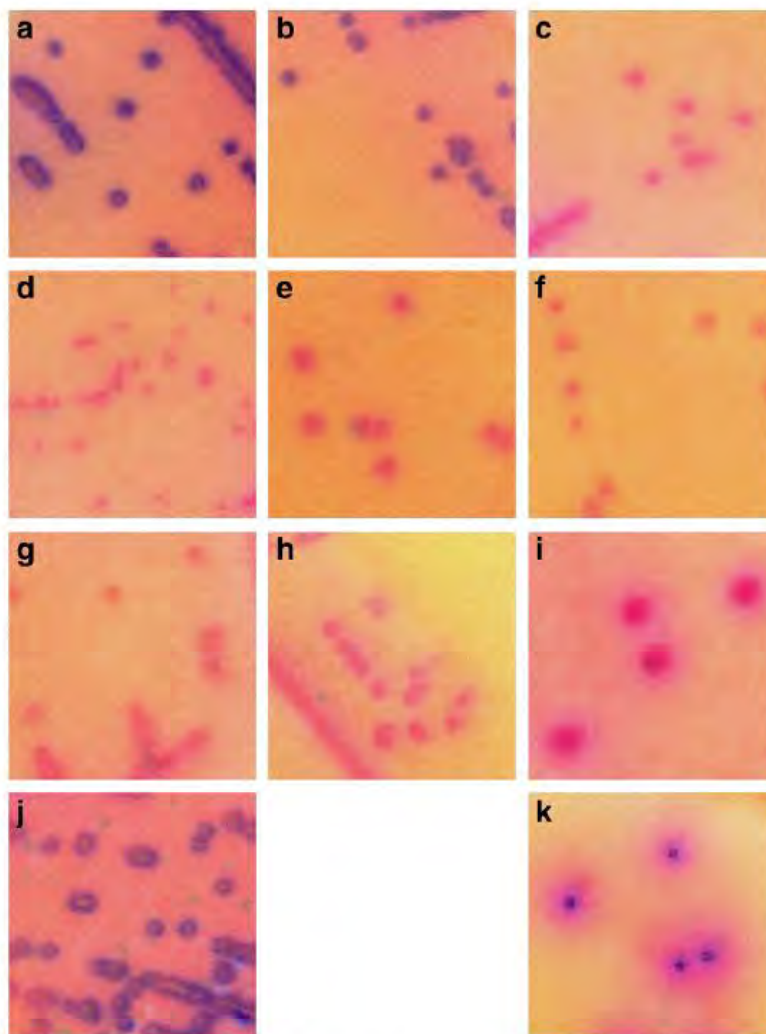
An explanation for the characteristic pink halo exhibited by *H. pylori* colonies could be related to its peculiar urease. The reported *H. pylori* urease Km is low (0.1 mM), and 5 to 10% is located externally (Nakagawa et al., 2005), while other bacterial ureases (i.e. from urinary tract, soil, or from some members of Enterobacteriaceae) present Km,s ranging between 0.7 and 130 mM, and are exclusively cytoplasmic (Bradley and Mobley, 1987; Mobley et al., 1995).

As we have stated, urease activity is the most important biochemistry test for *H. pylori* identification and it is the basis for most clinical tests (Mégraud and Lehours, 2007). Nevertheless, Mine et al. (2005) reported the clinical isolation of a urease-negative *H. pylori* mutant strain, capable of colonizing and inducing damage in gerbils. They indicate that the activity of the mutant is null, determined by the use of agar urea plates and confirmed by spectrophotometry, although they did not give any details on the latter methodology (Mine et al., 2005). The existence of spontaneously urease-negative mutants in cultures has been calculated and is extremely low ( $10^{-5}$  to  $10^{-6}$ ), and mutants do not completely lose their activity, measured by enzymatic assay (Pérez-Pérez et al., 1992; Segal et al., 1992). Considering the low frequency of spontaneous urease mutant's appearance, it is unlikely that it could affect *H. pylori* quantification by RPDT.

The presence of another urease positive *Helicobacter* species (such as *H. felis* and *H. rappini*) (Brandi et al., 2006), could be ruled out since in none of the control plates urease positive colonies were found. Moreover, Kuo et al. (2008) indicate that gerbils are not naturally infected with *H. pylori*. On the other hand, enteric campylobacters share oxidase and catalase activities, and the microaerophilic growth conditions with *H. pylori*, but they are not urease positive (Ding et al., 2001).

It is important to emphasize that the combined use of phenol red and bromothymol blue in RPDT urease reaction is responsible for the pink halo formation. It has been reported that this mixture increases the urease test sensitivity to detect *H. pylori* in biopsies, compared to the use of phenol red alone (Blanco-Delgado et al., 2001).

Oxidase activity determination is based on the reduction of TMPD by bacterial cytochrome oxidase (Kovacs' method). The use of a 1% solution has been recommended, but in the case of *H. pylori* RP, we



**Fig. 1.** Urease positive RPs by RPDT. C. *pseudogentialium* isolates, a: 58, b: 61, and c: 63; d: *A. urinae*; e: *B. sphaericus*; f: *B. brevis*; *S. simulans* isolates, g: 101 and h: 60. Collection strains, i: *P. vulgaris* ATCC 6808 and j: *P. aeruginosa* ATCC 27853; and k: *H. pylori* 43504. Each quadrant represents 2 cm<sup>2</sup>. *H. pylori* RP is different from those exhibited by positive urease strains, even from those that also share oxidase activity.

were able to register activity with solutions at 0.25%, thus diminishing costs. On the other hand, the contact of the oxidase impregnated disk with the urease disk helps to delimit *H. pylori* urease halos, making colony quantification easier.

RPDT made it also possible to test the catalase reaction on the paper disk by adding a hydrogen peroxide drop directly to the colony and observing the oxygen gas emission. The selectivity of RPDT could also be improved by the use of antibiotic-supplemented media.

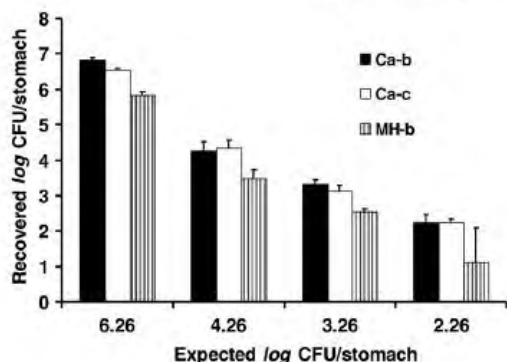
An important observation when performing RPDT is that urease-oxidase positive colony count must be made in the first 5 min, because after this time the reaction spreads all over the disk. Therefore, it is recommended to make a digital recording of the disk if quantification will be performed later.

In the assay in which *H. pylori* was seeded in gerbil stomach samples we demonstrated that its identification and quantification in complex cultures by RPDT is feasible. The amount of seeded bacteria

( $10^2$  to  $10^6$  CFU/stomach) was according to the reported *H. pylori* values found in colonized gerbils, as well as to the detection limit of the plate count. In this respect Tan et al. reported that *H. pylori* quantification in mouse stomach by real-time PCR is 5 to 60-fold higher than the detected by culture (Tan et al., 2007). Lee and Kim indicated that the detection limit in culture was log CFU 2/g of gerbil gastric tissue, emphasizing that the use of PCR is more sensitive (1 CFU/g) (Lee and Kim, 2006). But Mégraud and Lehours commented that some studies showed that the sensitivity of standard PCR is similar to that of culture for pretreatment diagnosis, since PCR sensitivity decreases notably when working with biological material (Mégraud and Lehours, 2007). With RPDT *H. pylori* colony identification and counting is carried out in a few minutes, and it would be cost-effective for screening a large number of samples.

In this work we focused on applying the RPDT for *H. pylori* identification and quantification in gerbil stomach samples, but it

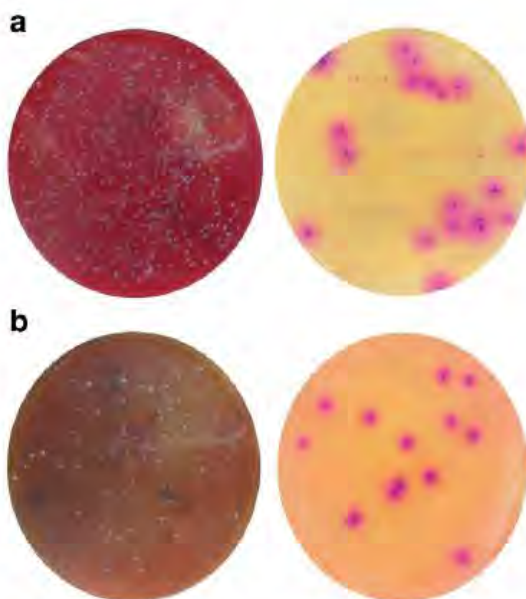




**Fig. 2.** Number of *H. pylori* recovered from gerbil stomach samples determined by RPDT. Ca = Casman base, MH = Mueller Hinton base, b = blood, c = cyclodextrin. All contain 7.5 mg/l amphotericin B, 3500 U polymyxin B sulfate, 10 mg/l vancomycin, and 5 mg/l trimethoprim. Expected CFU/stomach values are obtained from plate count in Ca-b media, which shows the best bacterial viability.

could also be applied to samples taken from other sources like water, food, as well as gerbil's feces to design a non-invasive identification method.

We conclude that RPDT is an excellent method to identify and quantify *H. pylori* colonies in mixed cultures based on their characteristic RP. The method, unlike others, has the advantage of not being restricted to the use of certain culture media, or to the addition of identification reagents in the medium; and, additionally, this method does not interfere with bacterial viability. It is a fast, simple, low-cost, and accessible technique to be considered as a routine method for the diagnosis of *H. pylori* in samples taken from different sources.



**Fig. 3.** Examples of mixed cultures obtained from gerbil's stomachs seeded with *H. pylori* (left) and their respective RP obtained (right). a) MH-b, and b) Ca-b plates. Disks were digitally registered with Hp scanner G4050.

## Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Graciela Castro Escarpulli of the Department of Medical Bacteriology of the National School of Biological Sciences, IPN, for her critical feedback and generous support in the identification of microorganisms. To MVZ Mario Soriano Bautista and to the Biotery of UNAM's Faculty of Science for providing the gerbils used in this study, and for the support in animal management. To Dr. José Luis Pérez García for checking the proper English usage in the manuscript.

To Universidad Nacional Autónoma de México, to the Doctorate in Biomedical Science and CONACyT for the support granted to I.C.-J. with No. of registry 203169. This work was partially supported by DGAPA-UNAM (IN-218108).

## References

- Blanco-Delgado, C.A., Rivera, P., Hernández, F., Hevia, F., Guillén, F., Durán, S., Miranda, S., 2001. Prevalencia de *Helicobacter pylori* en pacientes atendidos en el Hospital San Juan de Dios, San José, Costa Rica. *Rev. Biomed.* 12, 1–4.
- Bradley, D.J., Mobley, L.T., 1987. Genetic and biochemical diversity of ureases of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella* species isolated from urinary tract infection. *Infect. Immun.* 60, 3658–3663.
- Brandi, G., Biavati, B., Calabrese, C., Granata, M., Nannetti, A., Mattarelli, P., Di Febo, G., Saccoccio, G., Biasco, G., 2006. Urease-positive bacteria other than *Helicobacter pylori* in human gastric juice and mucosa. *Am. J. Gastroenterol.* 101, 1756–1761.
- Cellini, L., Allocati, N., Piccolomini, R., Di Campli, E., Dainelli, B., 1992. New plate for growth and detection of urease activity of *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1351–1353.
- Degnan, A.J., Sonzogni, W.C., Standridge, J.H., 2003. Development of a plating medium for selection of *Helicobacter pylori* from water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2914–2918.
- Ding, H.J., Liu, Y.C., Peng, C.F., Wang, W.M., Chen, Y.W., Huang, Y.F., Lin, C.C., Chen, C.Y., 2001. An efficient method for the culture of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies with two-section petri dishes. *J. Gastroenterol.* 36, 237–241.
- Hirayama, F., Takagi, S., Yokoyama, Y., Iwao, E., Ikeda, Y., 1996. Establishment of gastric *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *J. Gastroenterol.* 31, 24–28.
- Hirayama, F., Takagi, S., Iwao, E., Yokoyama, Y., Haga, K., Hanada, S., 1999. Development of poorly differentiated adenocarcinoma and carcinoid due to long-term *Helicobacter pylori* colonization in Mongolian gerbils. *J. Gastroenterol.* 34, 450–454.
- Honda, S., Fujioka, T., Tokieda, M., Satoh, R., Nishizono, A., Nasu, M., 1998. Development of *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinoma in Mongolian gerbils. *Cancer Res.* 58, 4255–4259.
- Ikono, T., Ota, H., Sugiyama, A., Ishida, K., Katsuyama, T., Genta, R.M., Kawasaki, S., 1999. *Helicobacter pylori*-induced chronic active gastritis, intestinal metaplasia, and gastric ulcer in Mongolian gerbils. *Am. J. Pathol.* 154, 951–960.
- Keto, Y., Takahashi, S., Okabe, S., 1999. Healing of *Helicobacter pylori*-induced gastric ulcers in Mongolian gerbils: combined treatment with omeprazole and clarithromycin. *Dig. Dis. Sci.* 44, 257–265.
- Kodama, M., Murakami, K., Sato, R., Okimoto, T., Nishizono, A., Fujioka, T., 2005. *Helicobacter pylori*-infected animal models are extremely suitable for the investigation of gastric carcinogenesis. *World J. Gastroenterol.* 11, 7063–7071.
- Kuo, C.H., Hu, H.M., Tsai, P.Y., Yan, S.F., Chang, L.L., Wang, J.Y., Chen, A., Jan, C.M., Wang, W.M., Wu, D.C., 2008. A better method for confirming *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *J. Gastroenterol.* 43, 32–37.
- Kusters, J.G., van Vliet, A.H., Kuipers, E.J., 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 449–490.
- Lee, J.U., Kim, O., 2006. Natural maternal transmission of *H. pylori* in mongolian gerbils. *World J. Gastroenterology* 21, 5663–5667.
- Mabe, K., Yamada, M., Oguni, I., Takahashi, T., 1999. *In vitro* and *in vivo* activities of tea catechins against *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1788–1791.
- Mégraud, F., Lehours, P., 2007. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 280–322.
- Mine, T., Muraoka, H., Saika, T., Kobayashi, I., 2005. Characteristics of a clinical isolated of urease-negative *Helicobacter pylori* and its ability to induce gastric ulcers in Mongolian gerbils. *Helicobacter* 10, 125–131.
- Mobley, H.L., Island, M.D., Hausinger, R.P., 1995. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.* 59, 451–480.
- Nakagawa, S., Osaki, T., Fujioka, Y., Yamaguchi, H., Kamiya, S., 2005. Long-term infection of Mongolian gerbils with *Helicobacter pylori*: microbiological, histopathological, and serological analyses. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12, 347–353.
- Ogura, K., Maeda, S., Nakao, M., Watanabe, T., Tada, M., Kyutoku, T., Yoshida, H., Shiratori, Y., Omata, M., 2000. Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in Mongolian Gerbil. *J. Exp. Med.* 192, 1601–1610.
- Ohkusa, T., Okayasu, I., Miwa, H., Ohtaka, K., Endo, S., Sato, N., 2003. *Helicobacter pylori* infection induces duodenitis and superficial duodenal ulcer in Mongolian gerbils. *Gut* 52, 797–803.
- Osaki, T., Hanawa, T., Manzoku, T., Fukuda, M., Kawakami, H., Suzuki, H., Yamaguchi, H., Yan, X., Taquchi, H., Kurata, S., Kamiya, S., 2006. Mutation of *luxS* affects motility

- and infectivity of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa of a Mongolian gerbil model. *J. Med. Microbiol.* 55, 1477–1485.
- Otsuka, T., Tsucamoto, T., Tanaka, H., Inada, K., Utsunomiya, H., Mizoshita, T., Kumagai, T., Katsuyama, T., Miki, K., Tatejima, M., 2005. Suppressive effects of fruit-juice concentrate of *Prunus mume* Sieb. Et Zucc. (Japanese apricot, Ume) on *Helicobacter pylori*-induced glandular stomach lesions in Mongolian gerbils. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 6, 337–341.
- Pérez-Pérez, G.I., Olivares, A.Z., Cover, T.L., 1992. Characteristics of *Helicobacter pylori* variants selected for urease deficiency. *Infect. Immun.* 60, 3658–3663.
- Queiroz, D.M., Mendes, E.N., Rocha, G.A., 1987. Indicator medium for isolation of *Campylobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 25, 2378–2379.
- Różalski, A., Skórczyk, Z., Kotelko, K., 1997. Potential virulence factors of *Proteus* bacilli. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 65–89.
- Sawada, Y., Sashio, H., Yamamoto, N., Hida, N., Akashi, H., Tonokatsu, Y., Sakagami, T., Fukuda, Y., Shimoyama, T., Nishigami, T., Uematsu, K., 1998. Pathologic changes in the glandular stomach and duodenum in a *H. pylori*-infected Mongolian gerbil model. *J. Clin. Gastroenterol.* 27, 141–143.
- Segal, E.D., Shon, J., Tompkins, L., 1992. Characterization of *Helicobacter pylori* urease mutants. *Infect. Immun.* 60, 1883–1889.
- Sun, Y.K., Monstein, H.J., Nilsson, L.E., Petersson, F., Borch, K., 2003. Profiling and identification of eubacteria in the stomach of Mongolian gerbils with and without *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 8, 149–157.
- Takeda, K., Utsunomiya, H., Kakiuchi, S., Okuno, Y., Oda, K., Inada, K., Tsutsumi, Y., Tanaka, T., Kakiuchi, K., 2007. Citrus auraptene reduces *Helicobacter pylori* colonization of glandular stomach lesions in Mongolian gerbils. *J. Oleo Sci.* 56, 253–260.
- Tan, M.P., Kaparakis, M., Galic, M., Pedersen, J., Pearse, M., Wijnburg, L.C., Janssen, P.H., Strugnell, R.A., 2007. Chronic *Helicobacter pylori* infection does not significantly alter the microbiota of the murine stomach. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1010–1013.
- Testerman, T.L., McGee, D.J., Mobley, H.L., 2001. *Helicobacter pylori* growth and urease detection in the chemically defined medium Ham's F-12 nutrient mixture. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3842–3850.
- Watanabe, T., Tada, M., Nagai, H., Sasaki, S., Nakao, M., 1998. *Helicobacter pylori* infection induces cancer in Mongolian gerbils. *Gastroenterology* 115, 642–648.
- Worthington, J.M., Fulghum, R.S., 1988. Cecal and fecal bacterial flora of the Mongolian gerbil and the chinchilla. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1210–1215.
- Yan, J., Luo, Y.H., Mao, Y.F., 2004. Establishment of *Helicobacter pylori* infection model in Mongolian gerbils. *World J. Gastroenterol.* 15, 852–855.

Solicitud de patente nacional: 10 de agosto 2010, con número de registro MX-a-2010-008774.

5 **Prueba rápida en disco de papel para identificar y cuantificar  
*Helicobacter pylori* en cultivos complejos.**

**Descripción de la invención**

Campo técnico de la invención.

10 La presente invención se relaciona con las pruebas *in vitro* para identificar *Helicobacter pylori* en cultivos, específicamente se refiere a una prueba *in vitro* en papel que permite identificar y cuantificar colonias de *Helicobacter pylori* presentes en cultivos complejos, mediante la determinación de las pruebas bioquímicas reconocidas mundialmente para su caracterización.

15

Antecedentes de la invención.

*Helicobacter pylori* referido de aquí en adelante como *H. pylori*, es una bacteria Gram negativa que coloniza el estómago humano y es el principal causante de la gastritis crónica activa y la úlcera péptica, además de que está  
20 catalogada como un carcinógeno grupo I por la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer.

Actualmente se cuenta con un modelo animal de infección por *H. pylori*, (Ikeno and cols. *Helicobacter pylori*-induced chronic active gastritis, intestinal metaplasia, and gastric ulcer in Mongolian gerbils. Am J Pathol. 154:951-60, 1999;  
25 Nakagawa and cols. Long-term infection of Mongolian gerbils with *Helicobacter pylori*: microbiological, histopathological, and serological analyses. Clin Diagn Lab Immunol.12:347-53, 2005) en el que se emplean gerbos de Mongolia (*Meriones unguiculatus*). En este roedor se han podido reproducir las principales patologías asociadas a la bacteria en humanos, como son la gastritis, úlcera gástrica y  
30 duodenal, atrofia, metaplasia intestinal así como cáncer. Los resultados obtenidos con este modelo animal, son extrapolables a humanos.

Actualmente la bacteria se identifica en los cultivos por medio de tres pruebas bioquímicas de rutina que detectan la actividad de ureasa, oxidasa y

catalasa. La primera se determina mediante la llamada prueba rápida de ureasa (PRU), que consiste en agregar una muestra bacteriana en una solución que contiene urea-rojo de fenol la cual se cataloga como positiva cuando el color vira a rojo. Para la prueba de oxidasa se emplea una placa comercial (Dryslide™ oxidase. Difco) que registra la actividad positiva por el viraje a color azul, en la zona donde se colocó la muestra. Finalmente, para registrar la actividad de catalasa se agrega una gota de peróxido de hidrógeno en un portaobjetos y posteriormente se añade la muestra, que se registra como positiva cuando se presenta la formación de burbujas.

10

No obstante que en cultivos puros realizar estas tres pruebas es factible, en cultivos de primo-aislamiento tanto de biopsias de humano o gerbos así como de otras fuentes contaminadas con la bacteria, como puede ser agua o alimentos, existe la presencia de contaminantes a pesar del uso de medios selectivos. Esto dificulta notablemente la identificación y sobre todo la cuantificación de *H. pylori*, debido a que se tiene que analizar cada una de las colonias pequeñas translúcidas presentes en la placa de cultivo para determinar su presencia o ausencia, lo que resulta poco práctico y tardado. Así también, la aparición de colonias contaminantes dificulta identificar a *H. pylori*, sobre todo cuando su número es bajo. Por otro lado, la PRU y la placa comercial (Dryslide™ oxidase. Difco) no permiten hacer distinciones entre bacterias como *H. pylori*, con actividad enzimática de ureasa y oxidasa alta, de las consideradas con actividad enzimática baja, aumentando el riesgo de registrar falsos positivos.

25 Para el caso específico de biopsias de estómago de gerbo, se han desarrollado algunos medios diferenciales como es el Belo Horizonte (BHM), así como otros que se basan en el mismo principio, en los que se incorpora el 2,3,5-trifeniltetrazolium, el cual es reducido por *H. pylori*, provocando un viraje de color de las colonias a dorado (Mine and cols. Characteristics of a clinical isolated of urease-negative *Helicobacter pylori* and its ability to induce gastric ulcers in Mongolian gerbils. *Helicobacter*. 10:125-31, 2005; Sun and cols. Profiling and identification of Eubacteria in the stomach of Mongolian gerbils with and without

*Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 8:149-157, 2003). Cabe señalar que esta reacción no es reconocida como una prueba de rutina para identificar a *H. pylori*, además de que la apariencia de la colonia fue determinada para la entonces llamada *Campylobacter pylori*, por comparación con otras bacterias control y no se da un fundamento claro del por qué, exclusivamente, las colonias de *H. pylori* serían las únicas en mostrar éste cambio de color (Queiroz and cols. Indicator medium for isolation of *Campylobacter pylori*. *J Clin Microbiol*. 25:2378-9, 1987). Por esta razón, en los estudios en los que se ha empleado estos medios se hace necesario confirmar su presencia mediante la aplicación de otras 10 pruebas, incluidas la determinación de ureasa, oxidasa y catalasa.

Otros medios diferenciales propuestos para la identificación de *H. pylori* en muestras de heces y agua, son los que se basan en la incorporación de rojo de fenol-urea a las placas (Cellini and cols, New plate for growth and detection of 15 urease activity of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*. 30:1351-1353, 1992. Degnan and cols. Development of a plating medium for selection of *Helicobacter pylori* from water samples. *Appl Environ Microbiol*. 69:2914-2918, 2003; Testerman and cols. *Helicobacter pylori* growth and urease detection in the chemically defined medium Ham's F-12 nutrient mixture. *J Clin Microbiol*. 39:3842- 20 3850, 2001). Estas pruebas tienen el principal inconveniente de que al agregar estos agentes al medio disminuyen la viabilidad de la bacteria y en algunos casos la inhiben por completo. También presentan el inconveniente de que solo se pueden usar medios translúcidos y que la reacción que se da en la placa se disemina en zonas grandes lo que impide realizar una cuantificación. Asimismo, la 25 presencia de *H. pylori* se registra por una sola prueba bioquímica (ureasa) de las tres reconocidas, por lo que existe la posibilidad de falsos positivos.

Por lo anterior, el objeto de la presente invención es proporcionar una prueba *in vitro* para identificar colonias de *H. pylori* (basada en las tres pruebas 30 bioquímicas de identificación de la bacteria), aplicable a cultivos complejos provenientes de diversas muestras, como son estómagos y de agua, basado en la transferencia de las colonias a un disco de papel en el cual la combinación de la

actividad de ureasa-oxidasa crean un patrón de reacción característico para las colonias de *H. pylori* que las hace perfectamente distinguibles del resto de las colonias contaminantes. Con esta prueba se reduce el tiempo de análisis, además, de que permite que se puedan cuantificar las colonias y puede ser usado  
5 rutinariamente en los laboratorios de investigación o de análisis clínicos, al igual que puede ser aplicado para análisis de calidad de agua, alimentos o de cualquier fuente de donde pueda ser aislada la bacteria.

Otro de los objetos de la presente invención es proporcionar una prueba *in*  
10 *vitro* para identificar colonias de *H. pylori* en la que los reactivos utilizados para la identificación de las colonias, no interfieran con la viabilidad de la bacteria y que no se restrinja su aplicación únicamente a medios translúcidos.

Un objeto adicional de la presente invención, es proporcionar una prueba *in*  
15 *vitro* que permita realizar una cuantificación de las colonias de *H. pylori* encontradas en los cultivos complejos.

Breve descripción de las figuras.

La figura 1. Cuadrante I muestra los elementos que integran la Prueba  
20 Rápida en Disco de Papel (PRDP), donde la letra A corresponde al disco impregnado con la solución para determinar la actividad de ureasa. La letra B corresponde al disco impregnado con la solución para determinar la actividad de oxidasa. La letra C hace referencia mediante un gotero a la solución de peróxido de hidrógeno para determinar la actividad de catalasa y por último la letra X indica  
25 la placa de agar con antibióticos selectivos para *H. pylori*, donde fue inoculada la muestra y después de varios días de incubación contiene colonias diversas, incluyendo de *H. pylori*. El Cuadrante II muestra los pasos a seguir para realizar la prueba de ureasa: los números 1 y 2, muestran la colocación del disco A sobre la placa de agar X con las colonias bacterianas para conseguir su transferencia al  
30 disco A; el número 3 representa el paso de la separación del disco A con las colonias bacterianas; y el número 4, indica en el disco A, la formación de halos de color rosa intenso únicamente en las colonias con actividad de ureasa alta como

es *H. pylori*. La presencia de colonias con actividad de ureasa baja se registra porque solo la colonia vira a rosa y no forman halos. El cuadrante III muestra los pasos a seguir para realizar la prueba de oxidasa, donde los números 1 y 2, esquematizan la colocación del disco B sobre el disco A donde ya se determinó previamente la actividad de ureasa; el número 3 esquematiza la separación de los discos quedando en el disco B las colonias con actividad de oxidasa baja, mientras que en el número 4 muestra en el disco A, solo aquellas colonias con actividad de oxidasa alta las cuales viran a color azul, pero únicamente las de *H. pylori* presentan un halo rosa, lo que en conjunto da el patrón de reacción para distinguir a las colonias de *H. pylori*. El cuadrante IV esquematiza la determinación de la actividad de catalasa, que consiste en agregar una gota de peróxido de hidrógeno a las colonias del disco A que muestren el patrón de reacción y así corroborar por la tercer prueba que sean colonias de *H. pylori*, a la vez que se cuantifican. La producción de burbujas de la colonia en los primeros 15 segundos se considera como ureasa-oxidasa-catalasa positiva, indicativo suficiente para señalar que es una colonia de *H. pylori*.

La figura 2 muestra una tabla con aislados de gerbos y cepas de colección con actividad de ureasa registrada con la Prueba Rápida en Disco de Papel de la presente invención. El análisis de estas actividades se realizó comparándolas con la velocidad e intensidad de la reacción que mostraron las colonias de *H. pylori*. La actividad de ureasa de *H. pylori* se da inmediatamente al contacto con el disco y se caracteriza por la formación de un halo de color rosa intenso. *Proteus vulgaris* tarda algunos segundos en dar actividad, el halo no se extiende mucho y el color rosa es mas tenue (\*\*). Para el caso de las otras bacterias, la actividad se da en el primer minuto y no se forma el halo (+). La actividad de oxidasa se considera alta (++) cuando la colonia vira a azul y baja cuando únicamente la reacción se da en el disco B, el impregnado con 0.25% de tetrametil-*p*-fenilendiamina (+). El número dentro del corchete [ ] indica el tiempo, en horas, en que crecieron las colonias y se aplicó la Prueba Rápida en Disco de Papel. El intervalo de confianza en la identificación de los aislados es obtenido mediante el método miniaturizado BBL crystal GP-ID cuya interpretación va del 1.0 que indica

100% de certeza en la identificación del microorganismo y arriba de 0.8 indica un valor confiable de identificación. Para el caso de *Corynebacterium pseudogenitalium* y de *Staphylococcus simulans*, el número que les sigue corresponde a diferentes aislados.

5

La figura 3 muestra la reacción obtenida de bacterias ureasas positivas no-*H. pylori* en la Prueba Rápida en Disco de Papel de la presente invención y se comparan con el patrón de reacción mostrado por *H. pylori* ATCC 43504 en la misma prueba. La línea 1, muestra a *Corynebacterium pseudogenitalium* aislado 10 de heces de gerbo, que muestra una reacción diferente al patrón de reacción de *H. pylori* mostrado en el recuadro K. El recuadro A es el aislado 58, acotado en la línea 1; el recuadro B es el aislado 61, acotado en la línea 1 y el recuadro C es el aislado 63, acotado en la línea 1. En la línea 2 se identifican los aislados: en el recuadro D de *Aerococcus urinae*, en el E de *Bacillus sphaericus* y en el F de 15 *Bacillus brevis*, los cuales también tienen patrones diferentes al recuadro K. La línea 3, corresponde a *Staphylococcus simulans* donde el recuadro G es el aislado 101 acotado en la línea 3 y el recuadro H es el aislado 60 acotado en la línea 3. Finalmente la línea 4 corresponde a cepas de colección: en el recuadro I se trata de *Proteus vulgaris* ATCC 6808 y en el recuadro J a *Pseudomonas* 20 *aeruginosa* ATCC 27853, con patrones de reacción también diferentes al del recuadro K.

La figura 4 presenta una gráfica que muestra la recuperación y cuantificación de *H. pylori*, aplicando la Prueba Rápida en Disco de Papel de la 25 presente invención, agregada a muestras de estómago de gerbos y crecida en diferentes medios tanto translúcidos como opacos. Ca = base Casman, MH = base Mueller Hinton, s = sangre, c = ciclodextrina y plus = anfotericina B 7.5mg/l, polimixina B 3,500 U, vancomicina 10mg/l y trimetoprim 5mg/l.

### 30 Descripción detallada de la invención.

La presente invención se refiere a una prueba *in vitro* para detección y cuantificación de *H. pylori* denominada Prueba Rápida en Disco de Papel (PRDP)



que integra las tres pruebas bioquímicas de identificación de la bacteria reconocidas mundialmente, con la novedad de que las colonias se transfieren a un primer disco de papel denominado A, donde en un primer paso registra la actividad de ureasa. Este disco A está impregnado con el reactivo 1 que consiste de azul de bromotimol a una concentración de 0.002 a 0.02%, rojo de fenol 0.005 a 0.05% y urea 4 a 6%, ajustando el pH de 2 a 6, preferentemente de 4.5, en agua bidestilada. El rojo de fenol y la urea son utilizados comúnmente para la prueba rápida de ureasa, el agregar bromotimol y realizar la reacción en el disco, permite un resultado que da la formación de un halo color rosa intenso que indica bacterias con actividad de ureasa alta. La combinación de dos indicadores de pH es necesaria para registrar la actividad en el disco y el bromotimol favorece que se puedan diferenciar colonias bacterianas con actividad de ureasa alta tal como *H. pylori*, por la formación de un halo de color rosa intenso que se da alrededor de las mismas en los primeros segundos, situación que no se da en aquellas colonias con baja actividad, que solo viran a color rosa. Para proseguir con la prueba y determinar la actividad de oxidasa, se utiliza un segundo disco de papel denominado B el cual está impregnado con el reactivo 2, que consiste de una solución de tetrametil-*p*-fenilendiamina menor al 1%, preferentemente al 0.25%, en agua y el cual al ser sobrepuesto en el disco A, (Figura 1) permite distinguir colonias con actividad de oxidasa alta (como es *H. pylori*) en el que las colonias presentes en el disco A viran a un color azul, mientras que las de baja actividad no dan reacción y únicamente se registra un viraje en el color a azul en el disco B.

Las ventajas que presenta el uso de discos de papel, es que los reactivos no interfieren con la viabilidad de la bacteria, ya que no se incorporan al medio de cultivo. También, facilita el estudio en conjunto de todas las colonias presentes en las placas, lo que reduce a su vez el tiempo de análisis. Por otra parte, las reacciones se pueden observar independientemente de la transparencia del medio.

30

Otra novedad de la Prueba Rápida en Disco de Papel en el estado de la técnica de las pruebas bioquímicas de identificación de *H. pylori*, es el efecto que

se consigue por la combinación de la actividad de ureasa-oxidasa en el disco A, que junto con las características peculiares de las colonias (pequeña y de lento crecimiento) muestran un patrón de reacción característico que consiste de un halo color rosa con un centro azul (Figura 3-K), que permiten distinguirla del resto de las contaminantes, incluso de aquellos que puedan compartir alguna o ambas actividades. No obstante esto, en la Prueba Rápida en Disco de Papel se realiza la tercer prueba que es la actividad de catalasa, para la cual se agrega una gota de peróxido de hidrógeno únicamente en las colonias ureasa-oxidasa positivas presentes en el disco A, donde la producción de burbujas de la colonia en los primeros segundos se considera como ureasa-oxidasa-catalasa positiva, indicativo suficiente para señalar que es una colonia de *H. pylori*. Otra ventaja importante de la presente invención es que permite realizar cuantificaciones, ya que el patrón de reacción de las colonias es claro y no se difumina como en los medios diferenciales basados en la actividad de ureasa.

15

#### Ejemplo de uso 1

La aplicación de la Prueba Rápida en Disco de Papel objeto de la presente invención se realiza de la siguiente manera:

*Transferencia de las colonias al disco de papel A y actividad de ureasa:* Se aplica en un disco de papel el reactivo 1, que consiste de azul de bromotimol 0.02%, rojo de fenol 0.05% y urea 6%, ajustada a pH de 4.5 cuya concentración es tal que permite registrar la actividad en el disco al que para fines de identificación se le denomina A. Se deja secar un minuto y se coloca sobre las placas con cultivo hasta que se humedezca por completo, acto seguido se desprende de la placa de cultivo. La actividad ureasa positiva para *H. pylori* se observa por la formación de un halo rosa alrededor de las colonias. Figura 1.

*Determinación de la actividad de oxidasa.* Para realizar la prueba se prepara el reactivo 2, haciendo una solución de tetrametil-*p*-fenilendiamina al 0.25%. Posteriormente, se asperja sobre un segundo disco de papel, que se denomina B para fines de identificación y sin dejar que se seque por completo se coloca sin aplicar presión, sobre el disco A del lado donde se encuentran las colonias. Se deja reaccionar de 10 a 20 segundos y se separan ambos discos. La reacción

positiva oxidasa para *H. pylori* se da cuando la colonia que se encuentra en el disco A, vira a color azul. El patrón de reacción que se observa para colonias de *H. pylori* ureasa-oxidasa positiva es un halo rosa con el centro azul. Figura 1.

*Determinación de la actividad de catalasa.* Esta prueba se realiza únicamente en las colonias ureasa-oxidasa positiva del disco A, en las cuales se agrega una gota de peróxido de hidrógeno a la vez que se realiza el conteo de las colonias ureasa-oxidasa-catalasa positivas. Se considera que la colonia es catalasa positiva cuando se presenta la formación de burbujas en los primeros 2 segundos.

10 Para determinar la especificidad y sensibilidad de los resultados obtenidos se presentan los siguientes estudios:

#### Ejemplo de uso 2: Estudio de especificidad

Con la presente invención, Prueba Rápida en Disco de Papel se puede  
15 detectar la actividad de ureasa y oxidasa responsables del patrón de reacción de colonias de *H. pylori*, permitiendo diferenciarlas de otras bacterias que no la presentan. Para determinar si el método es capaz de distinguir las colonias de *H. pylori* de otras colonias bacterianas que pudieran compartir estas actividades y que pueden estar presentes en los cultivos complejos, se realizó el aislamiento de  
20 la microbiota de algunas regiones del tracto digestivo del gerbo y posteriormente se analizaron con la Prueba Rápida en Disco de Papel.

De dos gerbos se obtuvieron las siguientes muestras: el estómago y el ante-estómago, así como el bolo alimenticio de cada una de éstas regiones, 2 cm  
25 de duodeno de la porción cercana al píloro y 40 mg de excremento fresco colectado del intestino grueso a una distancia de 3 cm con respecto al ano. Las muestras se homogenizaron en 2 ml de medio Brucella sin antibióticos y se realizaron diluciones 1:2 a excepción de las muestras de duodeno que fue de 1:5 y de excremento que fue de 1:10. Se sembró 0.1 ml de cada muestra en placas  
30 Mueller Hinton agar 5% sangre de carnero desfibrinada sin antibióticos y después de siete días de incubación se obtuvieron un total de 107 aislados. El análisis microscópico reveló que el 38.5% correspondió a una levadura, identificada como

*Candida guilliermondii* por el método miniaturizado API-20 C AUX. Del 61.5% restante, que correspondió a células bacterianas, se agruparon en 57 aislados finales de acuerdo a las características de la colonia y a la morfología bacteriana.

5 Para determinar el patrón de reacción de las colonias seleccionadas con la Prueba Rápida en Disco de Papel se sembraron por punción en Mueller Hinton agar 5% sangre de carnero desfibrinada sin antibióticos y se incubaron de 12 a 24 hrs, tiempo suficiente para observar cúmulos bacterianos. Se encontró que 25 de ellas mostraba como mínimo alguna de las tres actividades, de las cuales ocho  
10 mostraron la actividad de ureasa. Estas ocho fueron clasificadas con base en el criterio de Cowal y Steel en el grupo bacteriano al que pertenecían y se identificaron por el método miniaturizado BBL crystal GP-ID, como: *Corynebacterium pseudogenitalium*, *Aerococcus urinae*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus brevis* y *Staphylococcus simulans*. Figura 2. El patrón de reacción que  
15 presenta *H. pylori* ATCC 43504 es similar al de otras cepas de *H. pylori* como la ATCC 49503 así como de tres aislados gástricos y es claramente distinguible del de las ureasas positivas no-*H. pylori* a pesar de que puedan compartir las mismas actividades, como es el caso de *Corynebacterium pseudogenitalium* y *Pseudomonas auriginosa* como puede ser apreciado en las Figuras 2 y 3. *Proteus*  
20 *vulgaris* presentó la formación de un halo, pero más delimitado y mas tenue que el exhibido por *H. pylori*. Además, por la morfología de la colonia así como por la actividad negativa de oxidasa, el patrón de reacción que presenta es completamente distinguible del de *H. pylori* como se aprecia en la Figura 3.

25 Ejemplo de uso 3: Estudio de sensibilidad con muestras de estómago de gerbo

Para determinar la sensibilidad de la Prueba Rápida en Disco de Papel para identificar colonias de *H. pylori* en cultivos con contaminantes, se inocularon diferentes unidades formadoras de colonias (ufc) de la bacteria en muestras provenientes de estómagos completos de gerbos, para simular animales  
30 colonizados con diferente número de *H. pylori*.

Cinco gerbos se dejaron en ayuno por 24 hrs y se les extrajeron los estómagos. Posteriormente a cada uno de ellos se les raspó la mucosa con una cánula metálica y junto con los restos del estómago se homogenizaron de manera independiente en cinco tubos con 2 ml de medio Brucella, los cuales contienen a su vez  $10^6$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  y  $10^2$  ufc de *H. pylori*, así como un control al que no se le agregó la bacteria. Para el conteo en placa se realizaron diluciones seriales 1:10 sembrando 0.1 ml en placas Mueller Hinton-sangre-4 antibióticos, Casman-sangre-4 antibióticos y casman-ciclodextrina-4 antibióticos por triplicado. Se incubaron por cinco días y se determinó el número de ufc de *H. pylori*/estómago mediante la aplicación de la Prueba Rápida en Disco de Papel.

Mediante la Prueba Rápida en Disco de Papel se pudo determinar en diferentes medios de cultivo, valores cercanos al número de bacterias que fueron inicialmente agregadas a las muestras de estómago como se aprecia en la Figura 4. También, el método es capaz de indicar la presencia de un bajo número de colonias de *H. pylori* en cultivos con un grado alto de contaminantes. Por otro lado, hay que señalar que en ninguno de los controles en los cuales no se agregó *H. pylori*, se registró la presencia de colonias ureasas positivas o con un patrón de reacción similar a *H. pylori*.

20

#### Ejemplo de uso 4: Estudio de sensibilidad con muestras de agua corriente

A un cultivo de *H. pylori* ATCC 43504 ajustado a una Absorbencia a 600 nm de 0.1, se le realizaron diluciones seriales 1/10 hasta  $10^{-6}$  en muestras de agua corriente de la Ciudad Universitaria de la UNAM, para simular muestras con 100 ufc/ml, 1000 ufc/ml y 10,000 ufc/ml de *H. pylori*. Cada una de las diluciones se sembraron por triplicado en agar Casman 5%-sangre suplementada con polimixina 2.5mg/l, vancomicina 10mg/l, anfotericina 7.5mg/l y trimetoprin 5mg/l. Se incubaron en condiciones microaerófilas por 7 días y se aplicó la Prueba Rápida en Disco de Papel. La viabilidad de la bacteria disminuye notablemente en agua corriente, no obstante, la prueba es capaz de registrarla cuando se encuentra a una concentración igual o mayor de 10,000 ufc/ml en agua corriente.

La actividad de ureasa es la prueba bioquímica de referencia mas importante para la identificación de *H. pylori* y es la base para la mayor parte de las pruebas a nivel clínico. La formación del halo rosa en las colonias de *H. pylori* en el papel, es por las características bioquímicas peculiares que presenta su ureasa, así como por su ubicación. La  $K_m$  que es un parámetro cinético que da una idea de la afinidad de la enzima por el sustrato, por ejemplo a  $K_m$  bajas mayor afinidad y viceversa, la reportada para la enzima es de 0.1 mM además, del 5 al 10% de ella se localiza externamente, mientras que de manera general las ureasas de bacterias de tracto urinario, suelos o algunos miembros pertenecientes a la Familia *Enterobacteriaceae*, presentan  $K_m$ 's que van de 0.7-130 mM y estas enzimas se localizan exclusivamente en citoplasma.

La determinación de la actividad de oxidasa, está basada en el método de Kovacs, el cual se fundamenta en la reducción del tetrametil-*p*-fenilendiamina por las citocromo oxidases de las bacterias. En la práctica se recomienda que para obtener un mejor resultado se debe de usar una solución 1%, pero para el caso en particular de las colonias *H. pylori* la actividad la pudimos registrar con 0.25%, lo cual disminuye el costo y además permite hacer una distinción entre bacterias con actividad alta y baja. Por otra parte, el disco impregnado ayuda a delimitar los halos de las colonias de *H. pylori*, favoreciendo que se puedan contar mas fácilmente.

### Reivindicaciones

1.- Una prueba *in vitro* para identificar y cuantificar colonias de *H. pylori* en 5 cultivos simples o complejos que consiste de:

a) Un disco A, que es impregnado de una solución que contiene azul de bromotimol en concentración que puede ir de 0.002 a 0.02%, rojo de fenol en concentración de 0.005 a 0.05% y urea de 4 a 6%, ajustada a pH de 2 a 6, el cual se aplica sobre una placa de cultivo complejo y sirve de base para transferir las 10 colonias, así como para determinar la actividad de ureasa alta de las colonias de *H. pylori*, las cuales se identifican por la formación de un halo rosa intenso alrededor de las mismas. Utiliza la combinación de dos indicadores de pH necesarios para que se de claramente la formación del halo.

a') Un disco A, de acuerdo al inciso anterior, en que preferentemente se impregna 15 de una solución de azul de bromotimol 0.02%, rojo de fenol 0.05% y urea 6%, ajustada a pH de 4.5.

b) Un disco B, que es impregnado de una solución menor al 1% de tetrametil-*p*-fenilendiamina, el cual es sobrepuesto en el disco A y al cabo de unos segundos retirado. Su función consiste en permitir determinar la actividad de oxidasa alta de 20 colonias de *H. pylori* en el disco A, las cuales viran a color azul. De tal manera que la combinación de estas actividades (ureasa-oxidasa positiva) registradas en el disco A, son las responsables de mostrar el patrón de reacción característico que permite distinguir las colonias de *H. pylori* del resto de las contaminantes. Otra función del disco B, es que ayuda a delimitar los halos permitiendo que se 25 puedan cuantificar mas fácilmente las colonias de *H. pylori* en el disco A.

b') Un disco B, de acuerdo al inciso anterior, en que preferentemente se impregna de una solución de 0.25% tetrametil-*p*-fenilendiamina

c) Un gotero o contenedor que contiene peróxido de hidrógeno, el cual al agregarse a las colonias ureasa-oxidasa positivas presentes en el disco A, 30 permite determinar su actividad de catalasa.

2.- La prueba *in vitro* para identificar colonias de *H. pylori* en cultivos simples o complejos de conformidad con la reivindicación 1 caracterizada porque al aplicar el disco A sobre la placa de cultivo y posteriormente separarlo, se realiza una transferencia de las colonias tanto de *H. pylori* como de contaminantes al disco.

5

3.- La prueba *in vitro* para identificar colonias de *H. pylori* en cultivos simples o complejos de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque en contacto con colonias de *H. pylori* presenta la formación de un halo de color rosa intenso alrededor de las mismas.

10

4.- La prueba *in vitro* para identificar colonias de *H. pylori* en cultivos simples o complejos de la reivindicación 1, caracterizada por que en el disco A y con ayuda del disco B, se crea un patrón de reacción característico de las colonias de *H. pylori* que consiste en un halo de color rosa intenso alrededor de colonias azules.

15

5.- La prueba *in vitro* para identificar colonias de *H. pylori* en cultivos simples o complejos de la reivindicación 4, caracterizada porque al agregar el peróxido de hidrógeno el patrón de reacción permite que pueda realizarse un conteo a simple vista de las colonias, permitiendo cuantificarlas.

20

6. La prueba *in vitro* para identificar y cuantificar colonias de *H. pylori* en cultivos simples o complejos de la reivindicación 1, caracterizada porque puede aplicarse en cualquier cultivo complejo independientemente de la muestra, donde se pretende identificar la presencia de *H. pylori*.

25

7. La prueba *in vitro* para identificar y cuantificar colonias de *H. pylori* en cultivos simples o complejos de la reivindicación 1 caracterizada porque las muestras pueden ser de estómago de un mamífero, agua, diversos tipos de alimentos, heces, o saliva.

30



8. La prueba in vitro para identificar y cuantificar colonias de *H. pylori* en cultivos simples o complejos de la reivindicación 7 caracterizada porque las muestras de mamífero son preferentemente gerbos o humanos.

## Resumen

La presente invención se refiere a una prueba *in vitro* que permite identificar y cuantificar de manera rápida y sencilla colonias de *Helicobacter pylori* presentes en cultivos complejos, mediante la determinación de pruebas bioquímicas aceptadas mundialmente para su identificación; con la novedad de que se registran en un soporte sólido, en el cual la combinación de la actividad de ureasa-oxidasa crean un patrón de reacción característico, que las hace perfectamente distinguibles del resto de las colonias contaminantes.

15

20

25

30

35

40

45

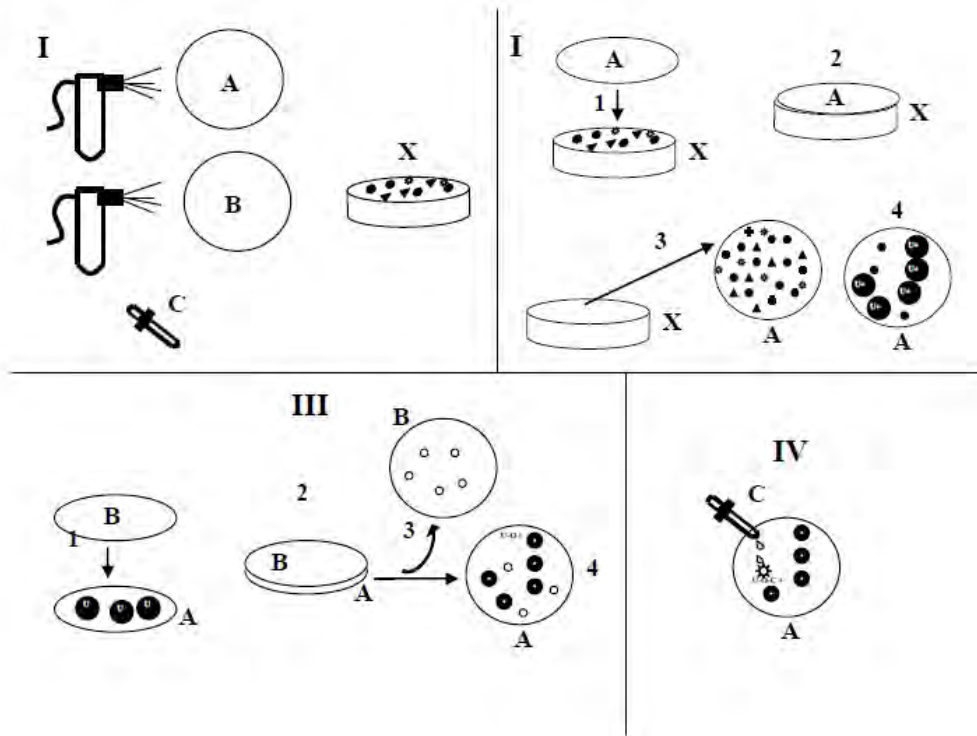
5

10

1/4

FIGURA 1

15



20

5

2/4

FIGURA 2

10

aislado	Intervalo de confianza	muestra	ureasa	oxidasa
<i>Aerococcus urinae</i> [48]	0.79	estómago	+	+
<i>Bacillus brevis</i> [18]	0.87	bolo del estómago	+	-
<i>Bacillus sphaericus</i> [18]	0.99	estómago	+	-
<i>Corynebacterium pseudogenitalium</i> 63[48]	0.88	heces	+	+
<i>Corynebacterium pseudogenitalium</i> 61[18]	0.88	heces	+	++
<i>Corynebacterium pseudogenitalium</i> 58[18]	0.79	heces	+	++
<i>Staphylococcus simulans</i> 101[18]	0.90	heces	+	+
<i>Staphylococcus simulans</i> 60[18]	0.88	heces	+	+
<i>Proteus vulgaris</i> [24]	nd	ATCC 6808	++	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> [18]	nd	ATCC 27853	+	++
<i>Helicobacter pylori</i> [120]	nd	ATCC 43504	++	++

15

20

25

5

FIGURA 3

10

15

20

25

30

35

40

45

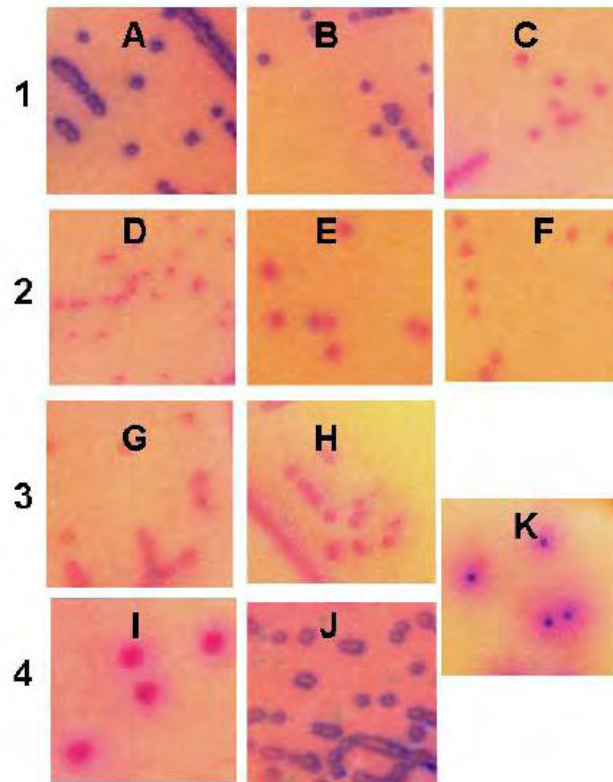


FIGURA 4

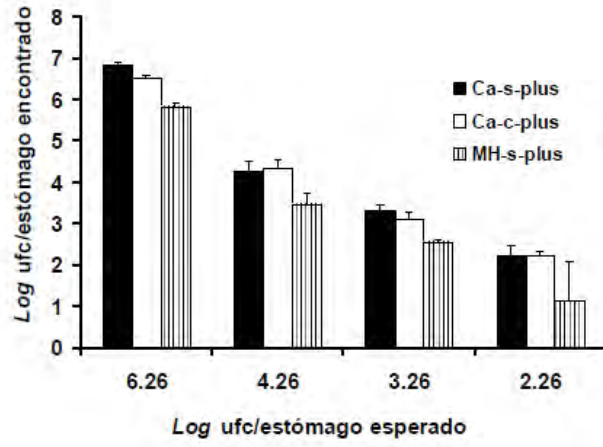
5

10

15

20

25



## PLANTAS CON ACTIVIDAD ANTI-*HELICOBACTER PYLORI*: UNA REVISIÓN

ISRAEL CASTILLO-JUÁREZ E IRMA ROMERO<sup>1</sup>

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Edificio D, 1° Piso,  
Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D.F., México.  
Tel. (52 55) 5623 2511, Fax. (52 55) 5616 2419.

<sup>1</sup>Autor para la correspondencia. Correo-e: irma@bq.unam.mx

**Resumen:** La bacteria *Helicobacter pylori* está reconocida como el principal agente causal de la gastritis crónica activa y de la úlcera péptica. Por muchos años, en la medicina tradicional se han utilizado diversas plantas para tratar estos padecimientos; sin embargo, sólo recientemente se ha empezado a investigar su posible efecto sobre la bacteria. Este trabajo compendia y analiza los estudios de plantas con actividad anti-*H. pylori* que hasta la fecha se han realizado. Se propone que la forma como pudieran estar actuando estas plantas sobre *H. pylori* es mediante un efecto atenuante de la población bacteriana y no mediante su erradicación, como lo hacen los antibióticos de la terapia anti-ulcerosa que actualmente se utiliza. Las especies vegetales se presentan como una fuente muy diversa para la obtención de compuestos activos con potencial bactericida, así como para el desarrollo de nuevas terapias diseñadas para el control de *H. pylori*.

**Palabras clave:** actividad anti-*H. pylori*, agentes derivados de plantas, gastritis, *Helicobacter pylori*, úlcera.

**Abstract:** The bacterium *Helicobacter pylori* is recognized as the main causal agent of active chronic gastritis and peptic ulcer. For many years, traditional medicine has made use of several plants for the treatment of these afflictions; nevertheless, their possible effect upon the bacterium has just begun to be investigated. This study summarizes and analyzes the studies, conducted up to date, of plants with anti-*H. pylori* activity. It is proposed that their action on *H. pylori* is mainly directed to the depletion of bacterial population rather than to its eradication, as the current anti-ulcer therapy does. Plant species are presented as a very diverse source of bactericidal compounds, as well as for the development of new therapies for *H. pylori* control.

**Key words:** anti-*H. pylori* activity, gastritis, *Helicobacter pylori*, plant derived agents, ulcer.

*Helicobacter pylori* es una bacteria polimórfica Gram negativa que habita en la superficie del epitelio del estómago humano. En 1994, fue declarada por la OMS como el principal agente causal de la úlcera péptica y la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer la clasificó como un carcinógeno grupo I (IARC, 1994; NIH, 1994). En 2005, los investigadores Barry J. Marshall y J. Robin Warren recibieron el premio Nobel de Fisiología o Medicina "por el descubrimiento de *H. pylori* y su papel en la gastritis y la úlcera péptica" (nobelprize.org).

La gastritis consiste en una serie de procesos inflamatorios e inmunes en la mucosa y submucosa del estómago, mientras que la úlcera es una etapa posterior e implica el rompimiento de la mucosa que sobrepasa la *muscu-*

*laris mucosae* y se puede presentar tanto en el estómago como en duodeno. Se sabe que la gastritis aguda es producida por diversos factores como son *H. pylori*, autoinmunidad, reflujo biliar, fármacos y sustancias tóxicas, pero para el caso de la gastritis crónica activa, la bacteria es la principal causante. Así mismo, es la responsable de 85% de las úlceras gástricas y de 95% de las duodenales, y está ligada al desarrollo de cáncer gástrico, el cual ocupa el segundo lugar dentro de la mortalidad por cánceres (Dixon, 1994; IARC, 1994; Kuipers *et al.*, 1995; Valle *et al.*, 1996; Ferlay *et al.*, 2001). Se estima que en los países desarrollados, entre 30 y 50% de las personas están colonizadas por *H. pylori*, fracción que asciende a 80% de la población en los países en vías de desarrollo

(Taylor y Parsonnet, 1995). Sin embargo, solamente de 10 a 20% desarrolla úlceras y de 1 a 2% cáncer gástrico (Ernst y Gold, 2000).

Para eliminar a la bacteria se utiliza un procedimiento denominado triple terapia, el cual consiste en la combinación de dos antibióticos (que pueden ser amoxicilina, metronidazol, tetraciclina o claritromicina) y un inhibidor de la secreción ácida (Goodwin, 1997; Dehesa *et al.*, 1998). Este tratamiento no es efectivo en alrededor de 20% de los casos, principalmente por la aparición de cepas resistentes, por lo que se ha propuesto la utilización de una segunda línea de tratamiento (una terapia cuádruple) en la que se añade bismuto y antibióticos diferentes de los previamente utilizados (Parente *et al.*, 2003). El uso de varios agentes en la terapia resulta limitado debido a los efectos secundarios que provocan, lo que sugiere que el tratamiento contra *H. pylori* necesita ser rediseñado (Gisbert y Pajares, 2002; McLoughlin *et al.*, 2004; Bytzer y O'Morain, 2005; Di Mario *et al.*, 2006; Ford *et al.*, 2006).

Aunque está demostrado el papel de la bacteria en las patologías descritas, existen evidencias de que no todas las cepas de *H. pylori* causan daño y se plantea que antes de iniciar una campaña de erradicación se debe estudiar cuáles serían los beneficios y las consecuencias de hacerlo. Actualmente se recomienda que se haga únicamente en los pacientes que presenten úlcera péptica y/o linfomas gástricos MALT (del inglés *mucosa-associated lymphoid tissue*) y en algunos casos de gastritis crónica activa (Blaser, 1992, 1997, 1998, 1999a, b).

Antes de reconocer a *H. pylori* como el principal agente etiológico de la gastritis y la úlcera péptica, la búsqueda de agentes derivados de plantas (AP) —extractos crudos, fracciones y compuestos— para tratar estas enfermedades ya había sido abordado. En estos trabajos se encontraron mecanismos de acción que involucraban efectos gastroprotectores o inhibidores de la secreción de ácido (Borelli e Izzo, 2000), pero actualmente se ha visto que muchas plantas reportadas etnobotánicamente para este tipo de padecimientos actúan también sobre el principal agente causal, la bacteria *H. pylori*.

La búsqueda de propiedades anti-*H. pylori* en plantas es reciente. El primer reporte que se tiene es de Cassel-Beraud *et al.* (1991), y es a partir de los últimos cinco años que este tipo de estudios ha aumentado considerablemente. El presente artículo compendia y analiza la información de los estudios que se han hecho hasta la fecha sobre plantas con actividad anti-*H. pylori* en todo el mundo.

### Plantas con actividad anti-*H. pylori*

En el apéndice 1 se enlistan 327 plantas, tanto de uso medicinal como comestible, a las que se les ha analizado su potencial anti-*H. pylori*. Se encuentran ordenadas por familias, seguidas por el nombre científico y el común:

este último se tomó del trabajo original, pero de aquellas plantas que también se distribuyen en México, así como de algunas que no se les reporta, se mencionan con el nombre común que se les da en nuestro país. Las familias, así como algunos nombres científicos, fueron corregidos o corroborados de acuerdo con la base de datos en línea del Jardín Botánico de Missouri, W<sup>T</sup>TROPICOS (consultada durante 2006). También se señala la actividad anti-*H. pylori*, la parte de la planta utilizada, así como el tipo de extracto que se probó.

En cuanto a la actividad anti-*H. pylori*, a 60.8% de estas especies se les ha identificado algún AP positivo, pero a la mayoría sólo se le ha demostrado con estudios *in vitro*. Cabe señalar que el criterio para considerarlas activas se basa en lo reportado por los autores que realizaron el análisis. Debido a la gran variación de las condiciones en las que fueron evaluados, no es posible definir un intervalo de inhibición significativo o hacer comparaciones de efectividad entre los distintos trabajos. En la última columna del apéndice 1 se indican los compuestos o grupos de compuestos identificados con actividad anti-*H. pylori*.

A continuación se reseñan los trabajos de las plantas a las cuales se les ha estudiado su efectividad anti-*H. pylori* *in vivo*, así como de aquellas que ayudan a contrarrestar el daño producido por la infección.

### *Brassica oleraceae* (brócoli)

Se ha investigado la eficacia del retoño fresco de brócoli para eliminar a *H. pylori* en pacientes infectados a dosis de 14, 28 y 56 g, suministrado dos veces al día por siete días. Al medir la respuesta mediante antígenos de suero, biopsias gástricas y por la prueba de la ureasa, se encontró una ligera mejoría en los pacientes que lo consumieron (Galan *et al.*, 2004). En otro estudio hecho con 438 empleados de una fábrica japonesa, por medio de encuestas y por medición de los pepsinógenos I y II (indicadores de daño y atrofia de la mucosa gástrica), se observó que no existía una asociación entre el consumo de brócoli y la baja prevalencia de gastritis crónica atrófica (Sato *et al.*, 2004). En un estudio posterior, se administraron yogures que contenían brócoli y brócoli fresco a voluntarios infectados con *H. pylori*; este tratamiento también resultó inefectivo para la erradicación de la bacteria (Opekun *et al.*, 2005). Sin embargo, el sulforofano (figura 1), compuesto muy abundante en el brócoli, es capaz de eliminar a *H. pylori* en cultivos de líneas de células epiteliales de estómago humano (HEp-2) infectadas con la bacteria (Fahey *et al.*, 2002; Haristoy *et al.*, 2005). Además, resultó efectivo (a una dosis de 1.33 mg/día, administrado vía catéter durante cinco días) para erradicar a la bacteria en ratones desnudos con injertos de tejido gástrico humano (xenógrafos) a los cuales se les infectó con *H. pylori* (Haristoy *et al.*, 2003).



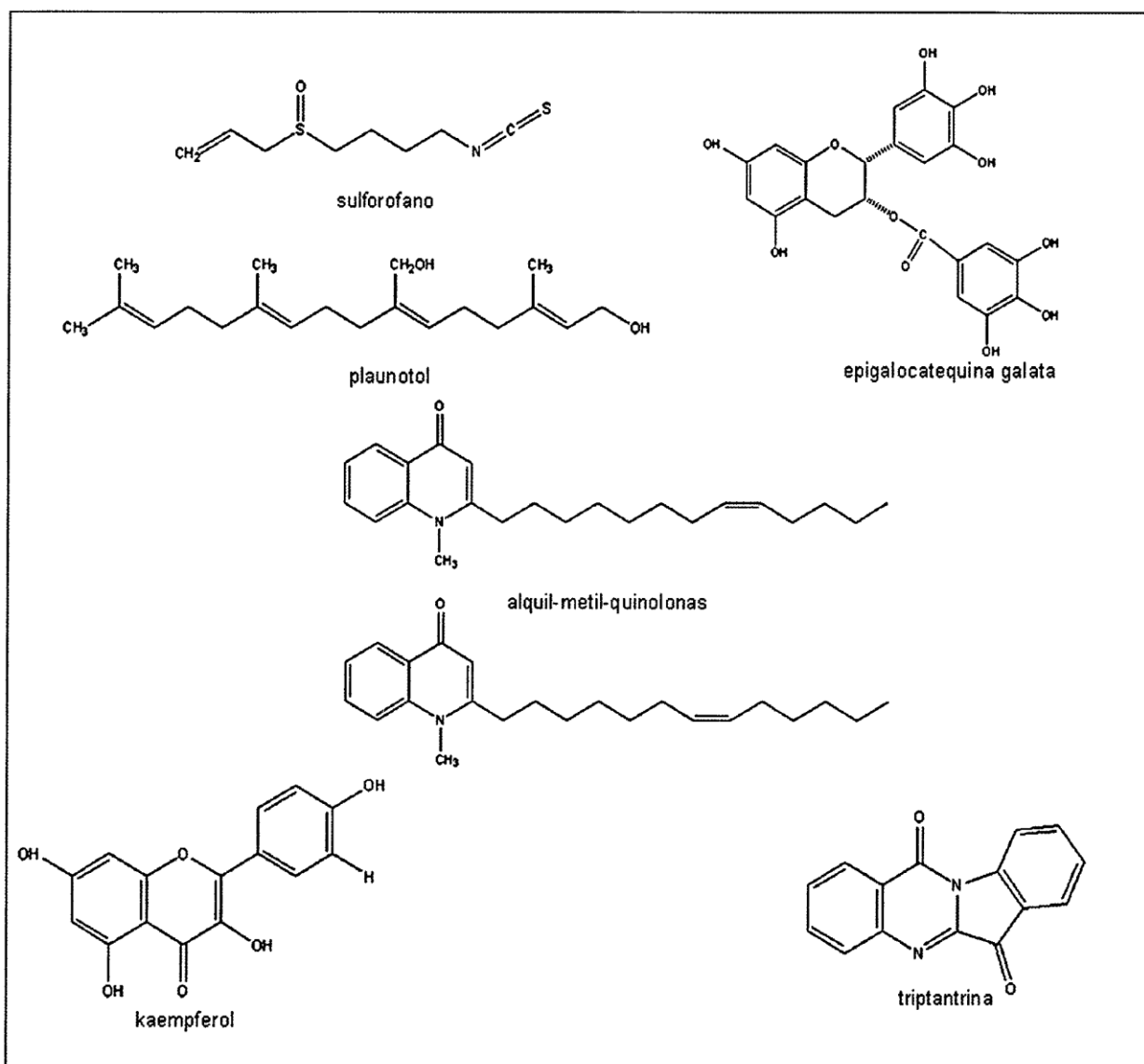


Fig. 1. Principales compuestos con actividad anti-*H. pylori* aislados de plantas.

***Camellia sinensis* (té negro, té verde, té de catequinas)**

De las hojas del árbol de *Camellia sinensis* se elabora el té verde (Polyphenon 70s®) y el té negro (Theaflavin®), cuya diferencia radica en que el segundo se somete a un proceso de fermentación. Ambos han mostrado capacidad para inhibir el crecimiento de *H. pylori* (Mabe *et al.*, 1999; Yee *et al.*, 2002; Matsubara *et al.*, 2003; Takabayashi *et al.*, 2004) y se ha identificado una mezcla de catequinas como la responsable. La eficiencia de estos compuestos está determinada por la presencia de ácido gálico, así como de grupos hidroxilos dentro de su estructura. De la mezcla de catequinas, la epigallocatequina galata (EGCG) (figura 1) es el compuesto mayoritario y el más activo

(Mabe *et al.*, 1999). Se han realizado varios estudios utilizando gerbos como modelo animal, en los que la mezcla de catequinas disminuye el número de bacterias y la erradica en 10-36% de los animales tratados. Entre los posibles mecanismos de acción de estos compuestos se ha demostrado que dañan la membrana, afectando la morfología de la bacteria y su movilidad, además de inhibir la actividad de la ureasa (Mabe *et al.*, 1999; Matsubara *et al.*, 2003). Contrario a esto, Tombola *et al.* (2003) no encontraron un efecto sobre la ureasa y proponen, junto con el trabajo de Yahiro *et al.* (2005), un mecanismo de acción directo sobre la citotoxina vacuolizante (Vac A) de *H. pylori*, tanto del té como de las catequinas. Por otro lado, se ha visto que la EGCG no sólo actúa sobre la bacteria,

sino que también protege a la mucosa gástrica de la apoptosis y del daño al ADN producidos por *H. pylori*, estimula la proliferación celular y, al evitar la glucosilación del TLR-4, atenúa la síntesis de mediadores pro-inflamatorios (Lee K.M. *et al.*, 2004).

#### ***Croton sublyratus* (croton, plaunoi)**

Al terpeno plaunotol, aislado de las hojas de *Croton sublyratus* (figura 1), se le ha atribuido una acción citoprotectora en la patología de la úlcera, pero también se ha visto que presenta un efecto bacteriolítico sobre *H. pylori* (Koga *et al.*, 1996). Asimismo, este compuesto inhibe la secreción de interleucina 8 (IL-8) y afecta la adhesión de la bacteria a las células epiteliales gástricas (Takagi *et al.*, 2000). Utilizando ratones como modelo animal, se ha observado que es capaz de disminuir el número de bacterias, efecto que es favorecido si se combina con amoxicilina y claritromicina (Koga *et al.*, 2002).

#### ***Evodia rutaecarpa* (gosyuyu, wu-chu-yu)**

Del fruto de esta especie se ha aislado una serie de quinolonas tipo alcaloide que inhiben el crecimiento de *H. pylori* (Rho *et al.*, 1999). Su eficacia *in vitro* es muy similar a la de los antibióticos de referencia utilizados en el estudio y no muestran toxicidad ni afectan la viabilidad de cultivos de células humanas (Hamasaki *et al.*, 2000). Las quinolonas 1-metil-2-[(Z)-8-tridecenil]-4-(1H)-quinolona y el 1-metil-2-[(Z)-7-tridecenil]-4-(1H)-quinolona (figura 1) son capaces de disminuir el número de bacterias en los estómagos de gerbos a dosis de 2, 10 y 20 mg/kg de peso administrados durante siete días, permitiendo además que exista una disminución en el infiltrado de neutrófilos en la mucosa gástrica. Se observó que la actividad anti-*H. pylori* aumenta si se combinan con un inhibidor de la secreción gástrica (Tominaga *et al.*, 2002). El mecanismo de acción aún no queda claro, pero se ha encontrado que este tipo de compuestos inhiben la síntesis del ADN bacteriano al actuar sobre la ADN girasa y la ADN topoisomerasa IV, además de que son inhibidores competitivos del transporte de electrones en la cadena respiratoria de la bacteria (Rho *et al.*, 1999; Tominaga *et al.*, 2002; Tominaga *et al.*, 2005).

#### ***Panax ginseng* (ginseng) y otras plantas con propiedades anti-adhesión**

Se han identificado varios compuestos con actividad anti-*H. pylori* de la raíz de *Panax ginseng*, siendo el panaxitriol el más activo (Bae *et al.*, 2001a). También se ha encontrado un grupo de carbohidratos de carácter ácido que muestran una actividad inhibitoria de la hemoaglutinación de la bacteria (Belogortseva *et al.*, 2000). Fracciones de polisacáridos, tanto del ginseng como de *Artemisia capillaris*,

inhiben el pegado de la bacteria a células epiteliales humanas derivadas de adenocarcinoma gástrico (Lee J.H. *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2006). En el caso del ginseng se ha encontrado un efecto protector, ya que es capaz de inhibir la muerte celular apoptótica, reducir el daño al ADN y atenuar la expresión del gen de la IL8 (Park *et al.*, 2005). Por otra parte, se han identificado polisacáridos ácidos de las semillas de *Ribes nigrum* y del jugo de *Abelmoschus esculentus* (quingombó) que inhiben la adhesión en secciones de mucosa gástrica humana al bloquear los receptores de superficie de la bacteria (Lengsfeld *et al.*, 2004a, b).

Los extractos acuosos de las hojas de *Arctostaphylos uva-ursi* y *Vaccinium vitis-idaea* presentan una actividad bacteriostática, la cual se atribuye a la gran cantidad de taninos que contienen y que además son capaces de modificar la hidrofobicidad de la superficie, aumentando la agregación celular (Annuk *et al.*, 1999). Por otro lado, algunos constituyentes de elevado peso molecular del jugo del fruto de *Vaccinium macrocarpon* inhiben la adhesión específica al ácido siálico, el cual es importante para las adhesinas de la bacteria (Burger *et al.*, 2000; Burger *et al.*, 2002; Shmueli *et al.*, 2004). El extracto acuoso de *V. macrocarpon* también presenta un efecto anti-*H. pylori* asociado a la presencia de compuestos fenólicos, que se ve favorecido por la combinación con *Origanum vulgare* (Lin *et al.*, 2005). En un estudio con pacientes *H. pylori* positivos se encontró un efecto positivo de *V. macrocarpon* en la eliminación de la bacteria a una dosis de 500 ml de jugo/día administrado oralmente durante 90 días y determinado por la prueba de la ureasa (Zhang *et al.*, 2005).

#### ***Polygonum tinctorium* (indigo japonés)**

Un conjunto de compuestos aislados de la planta presentan actividad anti-*H. pylori in vitro* (Hashimoto *et al.*, 1999), de los cuales el flavonoide kaempferol y el alcaloide triptantrina (figura 1) son capaces de disminuir el número de bacterias en estómagos de gerbos a una dosis de 5 mg/kg de peso, administrados durante 10 días. La triptantrina es más efectiva que el kaempferol, pero el efecto se aumenta si se administran conjuntamente. Sin embargo, el tratamiento con amoxicilina, claritromicina y metronidazol utilizado como control positivo resulta ser más efectivo que el de los tratamientos experimentales, aunque cabe señalar que en ninguno de los dos casos se logró erradicar a la bacteria por completo (Kataoka *et al.*, 2001).

#### **Mezclas herbales y extractos de diversas plantas**

El kampo hochu-ekki-to es ampliamente utilizado en Japón y es una mezcla de extractos acuosos calentados de distintas plantas ("raíz de Astragali, Ginseng, Angelicae, Bupleuri y Glycyrrhizae; rizoma de *Atractylodis lanceae*,

Cimicifugae y Gingiberis; fruto de Zizyphi y pericarpo de *Auranti nobilis*". composición reportada en Yan *et al.*, 2002). Esta mezcla inhibe el crecimiento de diferentes cepas de *H. pylori*, algunas de ellas resistentes a antibióticos comerciales (Imamura *et al.*, 1995; Hizuka *et al.*, 1997; Kijima *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 2002). Así mismo, disminuye el número de bacterias en ratones C57BL/6 infectados, a dosis de 1,000 mg/kg/día de extracto por 21 días (7 días antes de la inoculación y 14 posteriores), pero sólo se logra erradicar si se combina con otros antibióticos (Yan *et al.*, 2002).

El extracto acuoso de arroz sometido a un proceso de sacarización y fermentación muestra un efecto bacteriostático sobre *H. pylori*. En un modelo animal con gerbos infectados con la bacteria, se encontró que la administración *ad libitum* de este extracto durante 10 días causa una ligera reducción en el número de bacterias, además de reducir la inflamación y la proliferación epitelial de la mucosa gástrica (Murakami *et al.*, 2005).

El concentrado de jugo de albaricoque japonés *Prunus mume* (ume) reduce significativamente el número de bacterias en un modelo de infección con gerbos, a dosis de 1 y 3% de jugo en agua de beber durante 10 semanas, así como también disminuye la inflamación y el daño a la mucosa (hiperplasias) (Otsuka *et al.*, 2005). Del fruto se ha aislado e identificado el compuesto (+)-Siringaresinol, el cual inhibe la movilidad de *H. pylori in vitro* (Miyazawa *et al.*, 2006).

La actividad anti-*H. pylori* de extractos y compuestos de *Allium sativum* (ajo) *in vitro*, es de las más reportadas (Cellini *et al.*, 1996; Sivam *et al.*, 1997; Chung *et al.*, 1998; Jonkers *et al.*, 1999; Ohta *et al.*, 1999; Yoshida *et al.*, 1999; Mahady y Pendland, 2000; O'Gara *et al.*, 2000; Mahady *et al.*, 2001; Sivam, 2001; Cañizares *et al.*, 2002; Sovova *et al.*, 2002; Ohno *et al.*, 2003; Adeniyi y Anyiam, 2004; Cañizares *et al.*, 2004a, b) y sólo en algunos casos se han obtenido resultados negativos (Tabak *et al.*, 1996; O'Mahony *et al.*, 2005). Sin embargo, en los pocos estudios *in vivo* que se han hecho no se ha encontrado que afecte la viabilidad de la bacteria.

Introduciendo en la dieta de pacientes *H. pylori* positivos rebanadas de ajo y midiendo la infección por la prueba de la ureasa no se observó algún efecto en la disminución de la infección (Graham *et al.*, 1999). Tampoco se observaron resultados positivos con el tratamiento de una cápsula de 4 mg de aceite de ajo, administrada cuatro veces al día durante 14 días (McNulty *et al.*, 2001). Estos resultados se obtienen nuevamente utilizando un modelo de infección en gerbos, los cuales recibieron una dosis de extracto de ajo al 4% durante seis semanas, aunque en este caso sí se observa una reducción, dependiente de la dosis, de las hemorragias y de la gastritis en los grupos tratados (Iimuro *et al.*, 2002).

La actividad anti-*H. pylori* de extractos *in vitro* de la

corteza de *Cinnamomum cassia* (canela china) es muy eficiente; incluso éstos inhiben en el espectro de los antibióticos de referencia (ampicilina, tetraciclina y eritromicina). De esta planta se han aislado e identificado 57 constituyentes químicos, de los cuales 10 se han probado contra la bacteria, resultando el cinamaldehído el más activo (Tabak *et al.*, 1999). Contrario a estos resultados, se observó que el extracto alcohólico de *C. cassia*, administrado a pacientes infectados con *H. pylori* a una dosis de 80 mg/día por cuatro semanas, es incapaz de erradicar a la bacteria (Nir *et al.*, 2000).

Finalmente, el extracto metanólico de *Lafoensia pacari* (mangava-brava), administrado a una dosis de 500 mg por 14 días a 55 pacientes *H. pylori* positivos, dio resultados negativos (determinado mediante la prueba de rompimiento de urea) en la erradicación de la bacteria (da Mota Menezes *et al.*, 2006).

### Comentarios finales

Antes del descubrimiento de *H. pylori* como el principal agente etiológico de la gastritis crónica y la úlcera péptica, se creía que estas patologías se debían únicamente a un desequilibrio entre los factores defensivos y los agresivos de la mucosa gástrica, causado básicamente por el exceso de acidez, el estrés, la ingesta de algunos productos como el alcohol, los irritantes y algunos medicamentos. Los estudios de plantas con potencial anti-ulceroso eran realizados en modelos de ulceración producidos por métodos químicos y físicos (ligado del píloro, estrés, administración de fármacos antiinflamatorios no esteroideos, ácido clorhídrico, alcohol, etc.) (Robert *et al.*, 1979) y las actividades que se reportaban tenían que ver con efectos gastroprotectores e inhibidores de la secreción de ácido (Borrelli e Izzo, 2000).

Marshall y Warren (1984) propusieron que la gastritis y la úlcera péptica eran producidas principalmente por *H. pylori*. Sin embargo, hace apenas algunos años que se comenzó a buscar AP con una acción directa sobre ella (Mahady, 2005). Por otro lado, es también reciente el desarrollo de modelos animales, en los cuales la gastritis y la úlcera se producen por la infección de la bacteria (Sawada *et al.*, 1998; Watanabe *et al.*, 1998; Ikeno *et al.*, 1999).

Se han descrito ya varios AP que afectan la viabilidad de *H. pylori*, aunque aún no hay estudios orientados a conocer el mecanismo exacto por el cual lo hacen. El principal inconveniente sobre estos trabajos es que la mayoría sólo han sido realizados *in vitro* y las condiciones que se han utilizado presentan una gran variación (tamaño del inóculo, cepa bacteriana, tiempo de incubación, falta de uso de antibióticos de referencia, entre otras), lo que dificulta la realización de un análisis comparativo de la efectividad o la definición de un intervalo de inhibición significativo. Con el objetivo de estandarizar las condiciones

para el cálculo de la actividad mínima inhibitoria de compuestos sobre *H. pylori in vitro*, se han propuesto dos métodos, uno por el Comité Nacional para la Estandarización Clínica de Laboratorio y el otro por el Grupo Europeo de Estudio de *H. pylori* (Glupeczynski *et al.*, 1998). Cabe señalar que sólo en algunos trabajos de AP con actividad anti-*H. pylori* se han tomado en cuenta dichas recomendaciones (Yee y Koo, 2000; Haristoy *et al.*, 2003; Mahady *et al.*, 2005; Nostro *et al.*, 2005; De Marino *et al.*, 2006; Nostro *et al.*, 2006).

Se pueden clasificar los mecanismos por los cuales los AP pudieran aliviar las patologías producidas por *H. pylori* en varios niveles, pero hay que estar conscientes de que aún faltan más estudios y que muchos de ellos han mostrado que hay sinergismos que favorecen su actividad.

**1. Preventivo.** En esta categoría tendríamos plantas que se consumen frecuentemente en la dieta, como algunos frutos y especias. Aunque aún no está muy claro su papel, el brócoli, el ajo y el chile, al igual que algunos cítricos, podrían incluirse en este grupo (López-Carrillo y Fernández-Ortega, 1995; Zhang *et al.*, 1997; Yee *et al.*, 2002; Bergonzelli *et al.*, 2003; López-Carrillo *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005; O'Mahony *et al.*, 2005; Nakagawa *et al.*, 2006). Un factor indispensable para la colonización de la bacteria es el pegado a las células epiteliales del estómago, por lo que teniendo en cuenta los estudios realizados en *A. capillaris*, *P. ginseng* (Lee J.H. *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2006), *R. nigrum*, *A. esculentus* (Lengsfeld *et al.*, 2004a, b) y *V. macrocarpon* (Burger *et al.*, 2000; Burger *et al.*, 2002; Shmueli *et al.*, 2004), estas plantas podrían estar previniendo la infección de esta manera.

**2. Atenuante.** Probablemente este sea el principal mecanismo de acción de las plantas usadas tradicionalmente y que actúan sobre *H. pylori*, en el que se disminuye su número o retrasa su crecimiento. Este efecto se ha encontrado principalmente a nivel de extractos o mezclas herbales, como es el caso de las hojas de *A. uva-ursi* y *V. vitis-idea* (Annuk *et al.*, 1999), del kampo (Imamura *et al.*, 1995; Hizuka *et al.*, 1997; Kijima *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 2002), del arroz (Murakami *et al.*, 2005) y de *P. mume* (Otsuka *et al.*, 2005; Miyazawa *et al.*, 2006).

**3. Protector.** Muchos extractos y compuestos son capaces de atenuar el daño causado por la infección al disminuir la inflamación y el daño a la mucosa. Se ha reportado que disminuyen el infiltrado de polimorfos nucleares, atenúan la expresión o la secreción de interlucina 8, reducen el daño al ADN, inhiben la muerte celular apoptótica y favorecen la proliferación epitelial. Algunas de estas actividades o varias de ellas son exhibidas por la epigallocatequina galata aislada de *C. sinensis* (Lee K.M. *et al.*, 2004), el extracto de arroz (Murakami *et al.*, 2005), el jugo de *P.*

*mume* (Otsuka *et al.*, 2005), el *P. ginseng* (Park *et al.*, 2005), el plaunotol aislado de *C. sublyratus* (Takagi *et al.*, 2000) y algunas quinolonas de *E. rutaecarpa* (Tominaga *et al.*, 2002).

**4. Eliminador.** Se han encontrado diversos AP que presentan esta actividad en estudios *in vitro*, pero hasta la fecha, para ninguno de ellos se ha demostrado que elimine completamente a la bacteria *in vivo*. No obstante, los compuestos puros tienen un gran potencial para ser incluidos en la terapia en combinación con otros AP o antibióticos comerciales (Kawase y Motohashi, 2004).

Por otra parte, no toda la variedad de cepas de *H. pylori* son patógenas, ya que el daño se presenta únicamente bajo ciertas circunstancias y asociado a determinados genotipos bacterianos (Blaser, 2005). Recientemente se ha analizado el efecto de la eliminación de *H. pylori* a nivel mundial y se ha encontrado una correlación directa entre la disminución de la bacteria y el aumento en la incidencia del reflujo gastroesofágico, del síndrome de Barret y del cáncer de esófago. Esto ha llevado a pensar que la bacteria puede resultar benéfica para el humano, ya que su presencia, aparentemente, evita la aparición de estas enfermedades gástricas superiores (Blaser, 1992, 1997, 1998, 1999a, b, 2005; Akhter *et al.*, 2007).

Para explicar esta situación se ha sugerido que existe un equilibrio entre las diversas poblaciones de *H. pylori* y el humano que favorece una relación simbiótica, pero que el uso desmedido de antibióticos y la disminución de su incidencia en los niños (que son el principal amplificador de la bacteria en las poblaciones humanas) han provocado la selección de cepas y un decremento de la diversidad genética de las poblaciones de *H. pylori*, conduciendo a la relación patógena. Aparentemente, el desequilibrio entre *H. pylori* y el humano se ha hecho más evidente en las últimas décadas y ha ocasionado un aumento en la incidencia de la gastritis y de la úlcera péptica (considerada como una "enfermedad de la civilización" o de la era moderna) y el cáncer gástrico (Blaser, 1998). Sin embargo, el uso de plantas para tratar estos padecimientos es mucho más antiguo. ¿Cuál podría ser entonces el efecto de estas plantas sobre *H. pylori*?

La necesidad de utilizar terapias tan agresivas para eliminar a la bacteria indica su enorme adaptación para permanecer en el estómago y nos habla de lo difícil que sería lograr erradicarla usando un único AP. Si se compara la eficiencia de los AP con algunos antibióticos de referencia utilizados en los estudios, sólo algunos compuestos puros presentan una eficiencia similar *in vitro*. Además, no se ha demostrado que erradique a la bacteria *in vivo* y sólo se ve aumentado su efecto si se utilizan varios de ellos o se combinan con otros antibióticos (Jonkers *et al.*, 1999; Mabe *et al.*, 1999; Koga *et al.*, 2002; Tominaga *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2002; Takabayashi *et al.*, 2004; Nostro *et al.*, 2006).

Estos datos parecen indicar que los tratamientos tradicionales con plantas no han actuado, ni actúan, erradicando a la bacteria como se busca con las terapias que actualmente se utilizan. Es posible que antes del aumento en la incidencia de la úlcera y del cáncer gástrico, las plantas hayan tenido un papel fundamental en el mantenimiento del equilibrio *H. pylori*-humano, evitando el desarrollo de estas enfermedades.

Los estudios de plantas con posible actividad anti-*H. pylori* se han hecho con la idea de encontrar una total erradicación de la bacteria por parte de los AP, pero como se mencionó anteriormente, sólo es recomendable hacerlo en una pequeña parte de las personas colonizadas. Por tal razón, lejos de ver una desventaja en el efecto atenuante del crecimiento de *H. pylori* por parte de los AP hasta ahora reportados, su sinergismo con los efectos preventivo y gastroprotector, son una buena opción para el desarrollo de una terapia reguladora del equilibrio *H. pylori*-humano.

Como conclusión, se puede afirmar que para muchas especies vegetales reportadas etnobotánicamente en varias regiones del mundo para tratar la gastritis y las úlceras se ha encontrado que afectan la viabilidad de la bacteria *H. pylori*. La mayor parte de esta actividad ha sido analizada únicamente *in vitro*, procedimiento que requiere de una estandarización y de su corroboración con estudios *in vivo*. Muchos AP pueden actuar a diferentes niveles y favorecer la cura de la enfermedad por medio de efectos sinérgicos. Las plantas son una fuente muy diversa para la obtención de compuestos químicos con potencial bactericida, que pueden ser incluidos en las terapias de erradicación, exclusivamente en aquellos casos de patologías muy avanzadas (úlcera péptica y cáncer gástrico) y en los que es necesario eliminarla. Proponemos que el modo de acción de las plantas utilizadas tradicionalmente para padecimientos relacionados con la gastritis y la úlcera péptica, ha sido y es a través del control de la población de la bacteria y no eliminándola por completo, como se pretende con las terapias actuales.

### Agradecimientos

A Edelmira Linares Mazari por la revisión de los nombres comunes de las plantas del apéndice I. A Martha Alicia Lydia Macías Rubalcava y a los revisores anónimos por sus comentarios al manuscrito. A CONACyT por el apoyo 53043 del Fondo de Formación de Doctores. Israel Castillo es becario de CONACyT con No. Registro 203169.

### Literatura citada

Adeniyi B.A. y Anyiam F.M. 2004. *In vivo* anti-*Helicobacter pylori* potential of methanol extract of *Allium ascalonicum* Linn. (Liliaceae) leaf: susceptibility and effect on urease acti-

- vity. *Phytotherapy Research* **18**:358-361.
- Annuk H., Hirno S., Turi E., Mikelsaar M., Arak E. y Wadstrom T. 1999. Effect on cell surface hydrophobicity and susceptibility of *Helicobacter pylori* to medicinal plant extracts. *FEMS Microbiology Letters* **172**:41-45.
- Akhter Y., Ahmed I., Devi S.M. y Ahmed N. 2007. The co-evolved *Helicobacter pylori* and gastric cancer: trinity of bacterial virulence, host susceptibility and lifestyle. *Infectious Agents and Cancer* **2**:1-5.
- Bae E.A., Han M.J., Kim N.J. y Kim D.H. 1998. Anti-*Helicobacter pylori* activity of herbal medicines. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **21**:990-992.
- Bae E.A., Han M.J. y Kim D.H. 1999. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of some flavonoids and their metabolites. *Planta Medica* **65**:442-443.
- Bae E.A., Han M.J., Baek N. y Kim D.H. 2001a. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of panaxytriol isolated from ginseng. *Archives of Pharmaceutical Research* **24**:297-299.
- Bae E.A., Han M.J. y Kim D.H. 2001b. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of irisolidone isolated from the flowers and rhizomes of *Pueraria thunbergiana*. *Planta Medica* **67**:161-163.
- Basile A., Senatore F., Gargano R., Sorbo S., Del Pezzo M., Lavitola A., Ritieni A., Bruno M., Spatuzzi D., Rigano D. y Vuotto M.L. 2006. Antibacterial and antioxidant activities in *Sideritis italica* (Miller) Greuter et Burdet essential oils. *Journal of Ethnopharmacology* **107**:240-248.
- Beil W., Birkholz C. y Sewing K. 1995. Effects of flavonoids on parietal cell acid secretion, gastric mucosal prostaglandin production and *Helicobacter pylori* growth. *Arzneimittelforschung* **45**:697-700.
- Belogortseva N.I., Yoon J.Y. y Kim K.H. 2000. Inhibition of *Helicobacter pylori* hemagglutination by polysaccharide fractions from roots of *Panax ginseng*. *Planta Medica* **66**:217-220.
- Bergonzelli G.E., Donnicola D., Porta N. y Cortesey-Theulaz I.E. 2003. Essential oils as components of a diet-based approach to management of *Helicobacter* infection. *Antimicrobial and Agents Chemotherapy* **47**:3240-3246.
- Bhamarapavati S., Pendland S.L. y Mahady G.B. 2003. Extracts of spice and food plants from Thai traditional medicine inhibit the growth of the human carcinogen *Helicobacter pylori*. *In Vivo* **17**:541-544.
- Blaser M.J. 1992. Hypotheses on the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Gastroenterology* **102**:720-727.
- Blaser M.J. 1997. Not all *Helicobacter pylori* strains are created equal: should all be eliminated? *Lancet* **349**:1020-1022.
- Blaser M.J. 1998. Helicobacters are indigenous to the human stomach: duodenal ulceration is due to changes in gastric microecology in the modern era. *Gut* **43**:721-727.
- Blaser M.J. 1999a. Hypothesis: the changing relationships of *Helicobacter pylori* and humans: implications for health and disease. *The Journal of Infectious Diseases* **179**:1523-1530.
- Blaser M.J. 1999b. In a world of black and white, *Helicobacter pylori* is gray. *Annals of Internal Medicine* **130**:695-697.
- Blaser M.J. 2005. Global warming and the human stomach: microecology follows macroecology. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* **116**:65-76.
- Borrelli F. e Izzo A.A. 2000. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytotherapy Research* **14**:581-591.

- Burger O., Ofek I., Tabak M., Weiss E., Sharon N. y Neeman I. 2000. A high molecular mass constituent of cranberry juice inhibits *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucus. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **29**:295-301.
- Burger O., Weiss E., Sharon N., Tabak M., Neeman I. y Ofek I. 2002. Inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucus by a high-molecular-weight constituent of cranberry juice. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **42**:279-284.
- Bytzer P. y O'Morain C. 2005. Treatment of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* **10**:40-46.
- Cañizares P., Gracia I., Gómez L., Martín de Argila C. 2002. Optimization of *Allium sativum* solvent extraction for the inhibition of *in vitro* growth of *Helicobacter pylori*. *Biotechnology Progress* **18**:1227-1232.
- Cañizares P., Gracia I., Gómez L., Martín de Argila C., Boixeda D. y García A. 2004a. Thermal degradation of allicin in garlic extracts and its implication on the inhibition of the *in-vitro* growth of *Helicobacter pylori*. *Biotechnology Progress* **20**:32-37.
- Cañizares P., Gracia I., Gómez L., Martín de Argila C., Boixeda D. y García A. 2004b. Allyl-thiosulfonates, the bacteriostatic compounds of garlic against *Helicobacter pylori*. *Biotechnology Progress* **20**:397-401.
- Cassel-Beraud A.M., Le Jan J., Mouden J.C., Andriantsoa M. y Andriantsiferana R. 1991. Preliminary study of the prevalence of *Helicobacter pylori* in Tananarive, Madagascar and the antibacterial activity *in vitro* of 13 Malagasy medicinal plants on this germ. *Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar* **59**:9-23.
- Cellini L., Di Campli E., Masulli M., Di Bartolomeo S. y Allocati N. 1996. Inhibition of *Helicobacter pylori* by garlic extract (*Allium sativum*). *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **13**:273-277.
- Chatterjee A., Yasmin T., Bagchi D. y Stohs S. 2004. Inhibition of *Helicobacter pylori* *in vitro* by various berry extracts, with enhanced susceptibility to clarithromycin. *Molecular and Cellular Biochemistry* **265**:19-26.
- Chung J.G., Chen G.W., Wu L.T., Chang H.L., Lin J.G., Yeh C.C. y Wang T.F. 1998. Effects of garlic compounds diallyl sulfide and diallyl disulfide on arylamine N-acetyltransferase activity in strains of *Helicobacter pylori* from peptic ulcer patients. *The American Journal of Chinese Medicine* **26**:353-364.
- Chung J.G., Hsia T.C., Kuo H.M., Li Y.C., Lee Y.M., Lin S.S. y Hung C.F. 2001. Inhibitory actions of luteolin on the growth and arylamine N-acetyltransferase activity in strains of *Helicobacter pylori* from ulcer patients. *Toxicology in Vitro* **15**:191-198.
- Da Mota Menezes V., Atallah A.N., Lapa A.J. y Catapani W.R. 2006. Assessing the therapeutic use of *Lafoensia pacari* St. Hil. extract (mangava-brava) in the eradication of *Helicobacter pylori*: double-blind randomized clinical trial. *Helicobacter* **11**:188-195.
- De Leo M., De Tommasi N., Sanogo R., De Angelo V., Germano M.P., Bisignano G. y Braca A. 2006. Triterpenoid saponins from *Pteleopsis suberosa* stem bark. *Phytochemistry* **67**:2623-2629.
- De Marino, S., Borbone N., Gala F., Zollo F., Fico G., Pagiotti R. y Iorizzi M. 2006. New constituents of sweet *Capsicum annuum* L. fruits and evaluation of their biological activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**:7508-7516.
- Dehesa M., Larisch J., Dibildox M., Vega B., Di Silvio M., Rodriguez L., Camorlinga M., Almaguer I., Ramirez-Barba E. y Torres J. 1998. Comparison of 2 schedules based on pantoprazole for eradication of *Helicobacter pylori* in patients with active duodenal ulcer. *Revista de Gastroenterología de México* **63**:66-71.
- De Pasquale R., Germano M.P., Keita A., Sanogo R. e Iauk L. 1995. Antiulcer activity of *Pteleopsis suberosa*. *Journal of Ethnopharmacology* **47**:55-58.
- Di Mario F., Cavallaro L.G. y Scarpignato C. 2006. Rescue therapies for the management of *Helicobacter pylori* infection. *Digestive Disease* **24**:113-130.
- Dixon M.F. 1994. Pathophysiology of *Helicobacter pylori* infection. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **201**:7-10.
- Epifano F., Menghini L., Pagiotti R., Angelini P., Genovese S. y Curini M. 2006. *In vitro* inhibitory activity of boropinic acid against *Helicobacter pylori*. *Bioorganic and Medical Chemistry Letters* **16**:5523-5525.
- Ernst P.B. y Gold B.D. 2000. The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annual Review of Microbiology* **54**:615-640.
- Fabry W., Okemo P. y Ansorg R. 1996a. Activity of east African medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *Chemotherapy* **42**:315-317.
- Fabry W., Okemo P., Mwatha W.E., Chhabra S.C. y Ansorg R. 1996b. Susceptibility of *Helicobacter pylori* and *Candida* spp. to the east African plant *Terminalia spinosa*. *Arzneimittelforschung* **46**:539-540.
- Fahey J.W., Haristoy X., Dolan P.M., Kensler T.W., Scholtus I., Stephenson K., Talalay P. y Lozinicwski A. 2002. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**:7610-7615.
- Ferlay J., Bray F., Pisani P. y Parkin D.M. 2001. GLOBOCAN 2000: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, Version 1.0. IARC Cancer Base No. 5. IARC Press, Lyon.
- Ford A.C., Delaney B.C., Forman D. y Moayyedi P. 2006. Eradication therapy for peptic ulcer disease in *Helicobacter pylori* positive patients. Cochrane database of systematic reviews (Online) (2): Art. No.: CD003840. DOI: 10.1002/14651858.CD003840.pub4.
- Fukai T., Marumo A., Kaitou K., Kanda T., Terada S. y Nomura T. 2002. Anti-*Helicobacter pylori* flavonoids from licorice extract. *Life Sciences* **71**:1449-1463.
- Funatogawa K., Hayashi S., Shimomura H., Yoshida T., Hatano T., Ito H. y Hiray Y. 2004. Antibacterial activity of hydrolyzable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *Microbiology and Immunology* **48**:251-261.
- Gadhi C.A., Benharref A., Jana M. y Lozniewski A. 2001. Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Aristolochia paucineris* Pomel extracts. *Journal of Ethnopharmacology* **75**:203-205.
- Galan M.V., Kishan A.A. y Silverman A.L. 2004. Oral broccoli

- sprouts for the treatment of *Helicobacter pylori* infection: a preliminary report. *Digestive Diseases and Sciences* **49**:1088-1090.
- Germano M.P., Sanogo R., Guglielmo M., De Pasquale R., Crisafi G. y Bisignano G. 1998. Effects of *Pteleopsis suberosa* extracts on experimental gastric ulcers and *Helicobacter pylori* growth. *Journal of Ethnopharmacology* **59**:167-172.
- Gisbert J.P. y Pajares J.M. 2002. Review article: *Helicobacter pylori* infection and gastric outlet obstruction - prevalence of the infection and role of antimicrobial treatment. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **16**:1203-1208.
- Glupeczynski Y., Andersen L., López-Brea M. y Mégraud F. 1998. Towards standardisation of antimicrobial susceptibility of *H. pylori*: preliminary results by a European Multicentre Study Group. *Gut* **43**:A47.
- Goel R.K., Sairam K., Babu D., Tavares I.A. y Raman A. 2003. *In vitro* evaluation of *Bacopa monniera* on anti-*Helicobacter pylori* activity and accumulation of prostaglandins. *Phytomedicine* **10**:523-527.
- Goel R.K., Sairam K. y Raho C.V. 2001. Role of gastric antioxidant and anti-*Helicobacter pylori* activities in antiulcerogenic activity of plantain banana (*Musa sapientum* var. *paradisica*). *Indian Journal of Experimental Biology* **39**:719-722.
- Goodwin C.S. 1997. Antimicrobial treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Infectious Disease* **25**:1023-1026.
- Graham D.Y., Anderson S.Y. y Lang T. 1999. Garlic or jalapeño peppers for treatment of *Helicobacter pylori* infection. *American Journal of Gastroenterology* **94**:1200-1202.
- Hamasaki N., Ishii E., Tominaga K., Tezuka Y., Nagaoka T., Kadota S., Kuroki T. y Yano I. 2000. Highly selective antibacterial activity of novel alkyl quinolone alkaloids from a Chinese herbal medicine, Gosyuyu (wu-chu-yu), against *Helicobacter pylori* *in vitro*. *Microbiology and Immunology* **44**:9-15.
- Haristoy X., Angioi-Duprez K., Duprez A. y Lozniewski A. 2003. Efficacy of sulforaphane in eradicating *Helicobacter pylori* in human gastric xenografts implanted in nude mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**:3982-3984.
- Haristoy X., Fahey J.W., Scholtus I. y Lozniewski A. 2005. Evaluation of the antimicrobial effects of several isothiocyanates on *Helicobacter pylori*. *Planta Medica* **71**:326-330.
- Hashimoto T., Aga H., Chaen H., Fukuda S. y Kurimoto M. 1999. Isolation and identification of anti-*Helicobacter pylori* compounds from *Polygonum tinctorium* Lour. *Natural Medicines* **53**:27-31.
- Hizuka H., Higasa J. y Yamamoto I. 1997. Antibacterial effect of Kampo medicine against *Helicobacter pylori*. *Journal of New Remedies and Clinics* **46**:49-53.
- IARC [International Agency for Research on Cancer]. 1994. Live flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working group on the evaluation of Carcinogenic Risks to Human, Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* **61**:1-241.
- Ibrahim M., Khan A.A., Tiwari S.K., Habeeb M.A., Khaja M.N. y Habibullah C.M. 2006. Antimicrobial activity of *Sapindus mukorossi* and *Rheum emodi* extracts against *H. pylori*: *In vitro* and *in vivo* studies. *World Journal of Gastroenterology* **28**:7136-7142.
- Iimuro M., Shibata H., Kawamori T., Matsumoto T., Arakawa T., Sugimur T. y Wakabayashi K. 2002. Suppressive effects of garlic extract on *Helicobacter pylori*-induced gastritis in Mongolian gerbils. *Cancer Letters* **187**:61-68.
- Ikeno T., Ota H., Sugiyama A., Ishida K., Katsuyama A., Genta R.M. y Kawasaki S. 1999. *Helicobacter pylori*-induced chronic active gastritis, intestinal metaplasia, and gastric ulcer in Mongolian gerbils. *The American Journal of Pathology* **154**:951-960.
- Imai H., Osawa K., Yasuda H., Hamashima H., Arai T. y Sasatsu M. 2001. Inhibition by the essential oils of peppermint and spearmint of the growth of pathogenic bacteria. *Microbios* **106**:31-9.
- Imamura L., Tsuchiya M., Inada A., Nakanishi T. y Kobashi K. 1995. Inhibition of urease and growth of *Helicobacter pylori* by herb extracts. *Journal of Traditional Medicines* **12**:129-136.
- Isobe T., Doe M., Morimoto Y., Nagata K. y Ohsakai A. 2006. The anti-*Helicobacter pylori* flavones in a Brazilian plant, *Hyptis fasciculata*, and the activity of methoxyflavones. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **29**:1039-1041.
- Isobe T., Ohsaki A. y Nagata K. 2002. Antibacterial constituents against *Helicobacter pylori* of Brazilian medicinal plant, Pariparoba. *Yakugaku Zasshi* **122**:291-294.
- Jones N.L., Shabib S. y Sherman P.M. 1997. Capsaicin as an inhibitor of the growth of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiology Letters* **146**:223-227.
- Jonkers D., Van den Broek E., Van Dooren I., Thijs C., Dorant E., Hageman G. y Stobberingh E. 1999. Antibacterial effect of garlic and omeprazole on *Helicobacter pylori*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **43**:837-839.
- Kalpoutzakis E., Aligiannis N., Mentis A., Mitaku S. y Charvala C. 2001. Composition of the essential oil of two *Nepeta* species and *in vitro* evaluation of their activity against *Helicobacter pylori*. *Planta Medica* **67**:880-883.
- Kadota S., Basnet P., Ishii E., Tamura T. y Namba T. 1997. Antibacterial activity of trichorabdol A from *Rabdosia trichocarpa* against *Helicobacter pylori*. *Zentralblatt für Bakteriologie* **286**:63-67.
- Kataoka M., Hirata K., Kunikata T., Ushio S., Iwaki K., Ohashi K., Ikeda M. y Kurimoto M. 2001. Antibacterial action of tryptanthrin and kaempferol, isolated from the indigo plant (*Polygonum tinctorium* Lour.), against *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils. *Journal of Gastroenterology* **36**:5-9.
- Kawase M. y Motohashi N. 2004. Plant-derived leading compounds for eradication of *Helicobacter pylori*. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Infective Agents* **3**:89-100.
- Kawase M., Motohashi N., Satoh K., Sakagami H., Nakashima H., Tani S., Shirataki Y., Kurihara T., Spengler G., Wolfard K. y Molnar J. 2003. Biological activity of persimmon (*Diospyros kaki*) peel extracts. *Phytotherapy Research* **17**:495-500.
- Kijima H., Kajita S., Saito T., Isobe Y., Fukushima K., Kaneta K., Fujikawa T. y Akashi T. 1999. Effect of Anchu-san and Shakuyaku-Kanzo-to extract on *Helicobacter pylori*-induced gastric mucosal inflammation and delayed ulcer healing in Mongolian Gerbils. *Japanese Pharmacology & Therapeutics* **27**:1493-1499.
- Kim D.H., Bae E.A. y Han M.J. 1999. Anti-*Helicobacter pylori*

**Apéndice 1.** Plantas con estudios de actividad anti-*Helicobacter pylori*. Simbología: ▲ = Con actividad anti-*H. pylori*; ◆ = Inhiben adhesión; ► = Sin actividad anti-*H. pylori*; ( ) = solvente utilizado para la extracción; ● = Reporte de estudio con actividad gastroprotectora y/o anti-ulceroso; — Información no disponible.

Familia y nombre científico	Nombre común	Parte probada	Grupos químicos identificados
<b>Aizoaceae</b>			
<i>Mollugo cerviana</i>	Anisillo	▲ Semilla (agua); O'Mahony <i>et al.</i> (2005)	
<b>Amaranthaceae</b>			
<i>Achyranthes japonica</i>	Flor de barcia	► Raíz (agua); Bae <i>et al.</i> (1998)	
<i>Amaranthus spinosus</i>	Quintonil	► Raíz (etanol); Wang y Huang (2005a)	
<i>Amaranthus viridis</i>	Amaranto verde	► Tallo (etanol); Wang y Huang (2005a)	
<b>Anacardiaceae</b>			
<i>Anacardium occidentale</i>	Nuez de la India	▲ Fruto y falso fruto (etanol); Kubo <i>et al.</i> (1999)	Fenoles; Kubo <i>et al.</i> (1999)
<i>Pistacia lentiscos</i> ●	Lentisco	▲ Goma y resina; Marone <i>et al.</i> (2001)	
<i>Rhus chinensis</i>	Agalla china		Tanino; Funatogawa <i>et al.</i> (2004)
<i>Rhus javanica</i>	Sumac	▲ Galla rhois [agallas] (agua); Bae <i>et al.</i> (1998)	
<i>Rhus semialata</i>	Sumac	► Tallo (etanol); Wang y Huang (2005a)	
<b>Apiaceae</b>			
<i>Angelica coreana</i>	—	► Raíz (agua); Bae <i>et al.</i> (1998)	
<i>Angelica dahurica</i>	Bai zhi	▲ Raíz (agua); Bae <i>et al.</i> (1998)	
<i>Angelica gigas</i>	—	▲ Raíz (agua); Bae <i>et al.</i> (1998)	Cumarinas; Bae <i>et al.</i> (1998)
<i>Angelica tenuissima</i>	—	► Raíz (agua); Bae <i>et al.</i> (1998)	
<i>Anthriscus sylvestris</i>	Mirra	► Raíz (agua); Bae <i>et al.</i> 1998	
<i>Bupleurum chinense</i>	Chai hu	▲ Parte aérea (etanol y agua); Li <i>et al.</i> (2005)	
<i>Bupleurum falcatum</i> ●	Thorow-wax	► Raíz (agua); Bae <i>et al.</i> (1998)	
<i>Carum carvi</i> ●	Alcaravea	▲ Semilla (metanol); Mahady <i>et al.</i> (2005)	Aceite esencial; Bergonzelli <i>et al.</i> (2003), May <i>et al.</i> (2003)
<i>Centella asiatica</i> ●	Centella asiática, hierba de clavo	► Planta completa (etanol); Wang y Huang (2005a)	
<i>Cnidium officinale</i>	—	► Rizoma (agua); Bae <i>et al.</i> (1998)	
<i>Coriandrum sativum</i>	Cilantro, culantro	► Semilla (agua); O'Mahony <i>et al.</i> (2005)	
<i>Cuminum cyminum</i>	Comino	▲ Semilla (agua y etanol); Nostro <i>et al.</i> (2005)	
		▲ Semilla (agua); O'Mahony <i>et al.</i> (2005)	
		▲ Semilla (etanol); Nostro <i>et al.</i> (2005)	
		▲ Semilla (metanol); Mahady <i>et al.</i> (2005)	
<i>Daucus carota</i>	Zanahoria		Aceite esencial; Bergonzelli <i>et al.</i> (2003)
<i>Foeniculum vulgare</i> ●	Hinojo	► Fruto (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
		► Fruto (etanol); Li <i>et al.</i> (2005)	
		► Semilla (agua y etanol); Nostro <i>et al.</i> (2005)	
		▲ Semilla (metanol); Mahady <i>et al.</i> (2005)	
<i>Ligusticum chuanxiong</i>	Chuang xiong	▲ Raíz (etanol); Li <i>et al.</i> (2005)	
<i>Petroselinum crispum</i>	Perejil	▲ Hoja (agua); O'Mahony <i>et al.</i> (2005)	
		► Parte aérea (metanol); Mahady <i>et al.</i> (2005)	
<i>Pimpinella anisum</i>	Pimpinela blanca, anís	▲ — (metanol); Mahady <i>et al.</i> (2005)	Aceite esencial; Bergonzelli <i>et al.</i> (2003)
<i>Trachyspermum copticum</i>	Ajwain	▲ Parte aérea (metanol); Nariman <i>et al.</i> (2004)	



PLANTAS CON ACTIVIDAD ANTI-*HELICOBACTER PYLORI*

Familia y nombre científico	Nombre común	Parte probada	Grupos químicos identificados
<i>Magnolia sieboldii</i>	Magnolia oyama	▲ Corteza (metanol); Park <i>et al.</i> (1997)	Costunolida; Park <i>et al.</i> (1997)
<i>Schisandra chinensis</i>	Wu-wei-zi	▲ Fruto (etanol); Li <i>et al.</i> (2005) ► Fruto (agua); Bae <i>et al.</i> (1998)	
<b>Malpighiaceae</b>			
<i>Malpighia emarginata</i>	Cereza de Barbados	▲ Fruto (hexano); Motohashi <i>et al.</i> (2004)	
<b>Malvaceae</b>			
<i>Abelmoschus esculentus</i>	Planta de quingombó	◆ Fruto (agua); Lengsfeld <i>et al.</i> (2004a) ► Fruto (jugo); Lengsfeld <i>et al.</i> (2004b)	
<i>Hibiscus mutabilis</i>	—	► Planta completa (etanol); Wang y Huang (2005a)	
<i>Sida rhombifolia</i>	Barbarisco	► Planta completa (etanol); Wang y Huang (2005a)	
<b>Melastomataceae</b>			
<i>Melastoma candidum</i>	Melastoma asiática	► Tallo y raíz (etanol); Wang y Huang (2005a)	Tanino; Funatogawa <i>et al.</i> (2004)
<b>Meliaceae</b>			
<i>Azadirachta indica</i> ●	Árbol de neem	► Corteza (metanol) y hojas (metanol); Fabry <i>et al.</i> (1996a)	
<i>Melia toosendan</i>	Chuan lian zi	► Fruto (etanol y agua); Li <i>et al.</i> (2005)	
<b>Menispermaceae</b>			
<i>Coscinium fenestratum</i>	Falso columbo de Ceilán	▲ Raíz (agua); O'Mahony <i>et al.</i> (2005)	
<i>Tinospora sagittata</i>	Gagnep	► Raíz (etanol y agua); Li <i>et al.</i> (2005)	
<b>Musaceae</b>			
<i>Musa sapientum</i>	Plátano	► Fruto (metanol); Goel <i>et al.</i> (2001)	
<b>Myristicaceae</b>			
<i>Myristica fragans</i>	Nuez moscada	▲ Aril (metanol); Bhamarapavati <i>et al.</i> (2003) ▲ Kernel (agua); O'Mahony <i>et al.</i> (2005) ▲ Raíz (metanol 95%); Mahady <i>et al.</i> (2005)	
<b>Myrtaceae</b>			
<i>Eucalyptus globosa</i>	Eucalipto		Aceite esencial; Bergonzelli <i>et al.</i> (2003)
<i>Eucalyptus</i> spp.	Eucalipto		Taninos; Funatogawa <i>et al.</i> (2004)
<i>Eugenia caryophyllata</i>	Clavo	▲ Flor (agua); Bae <i>et al.</i> (1998); (agua y metanol); Li <i>et al.</i> (2005)	Aceite esencial; Bergonzelli <i>et al.</i> (2003)
<i>Leptospermum scoparium</i>	Manuka		Aceite esencial; Bergonzelli <i>et al.</i> (2003)
<i>Melaleuca leucadendron</i>	Maleleuca		Polifenol y terpeno; Funatogawa <i>et al.</i> (2004)
<i>Melaleuca quinquenervia</i>	Maleleuca	▲ Hoja (metanol); Bhamarapavati <i>et al.</i> (2003)	
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Árbol de té		Aceite esencial; Bergonzelli <i>et al.</i> (2003)
<i>Psidium guajava</i>	Guayabo	► Hoja (etanol); Wang y Huang (2005a)	Tanino; Funatogawa <i>et al.</i> (2004)
<i>Syzygium aromaticum</i>	Clavo	▲ Hoja (metanol); Bhamarapavati <i>et al.</i> (2003)	

Familia y nombre científico	Nombre común	Parte probada	Grupos químicos identificados
<b>Oleaceae</b>			
<i>Forsythia viridissima</i>	Mimosa de París	► Fruto (agua); Bae <i>et al.</i> (1998)	
<i>Ligustrum vulgare</i>	Trueno	▲ Parte aérea (mezcla); Nariman <i>et al.</i> (2004)	
<i>Ximenia caifra</i>	Ciruela agria grande	▲ Raíz (metanol); Fabry <i>et al.</i> (1996a)	
<b>Onagraceae</b>			
<i>Ludwigia octovalvis</i>	Hierba de clavo	► Tallo (etanol); Wang y Huang (2005a)	
<i>Oenothera stricta</i>	—		Taninos; Funatogawa <i>et al.</i> (2004)
<b>Opocynaceae</b>			
<i>Catharanthus roseus</i>	Cielo razo	► Planta completa (etanol); Wang y Huang (2005a)	
<b>Orchidaceae</b>			
<i>Bletilla formosana</i>	Orquídea blanca	► Tallo (etanol); Wang y Huang (2005a)	
<i>Bletilla striata</i>	Orquídea jacinto	► Tallo (etanol); Li <i>et al.</i> (2005)	
<b>Papaveraceae</b>			
<i>Sanguinaria canadensis</i>	Sanguinaria de Canadá	▲ Rizoma (metanol); Wang y Huang (2005a)	Alcaloides; Mahady <i>et al.</i> (2003a)
<b>Passifloraceae</b>			
<i>Passiflora incarnata</i>	Pasiflora	▲ Parte aérea (metanol); Mahady <i>et al.</i> (2005)	
<b>Pinaceae</b>			
<i>Abies maritima</i>	Pino		Aceite esencial; Bergonzelli <i>et al.</i> (2003)
<i>Cedrus libani</i>	Cedro del Líbano	▲ Cono (metanol); Yesilada <i>et al.</i> (1999)	
<b>Piperaceae</b>			
<i>Piper longum</i>	Pimienta	► Estaca (etanol y agua); Li <i>et al.</i> (2005) ▲ Semilla (agua); O'Mahony <i>et al.</i> (2005)	
<i>Piper nigrum</i>	Pimienta negra	► Semilla y fruto (agua); O'Mahony <i>et al.</i> (2005)	
<i>Pothomorphe umbellata</i>	Santa María, cordoncillo		Alcaloides y flavonoides; Isobe <i>et al.</i> (2002)
<b>Plumbaginaceae</b>			
<i>Plumbago zeylanica</i>	—	▲ Tallo (etanol, agua, acetona); Wang y Huang (2005a)	Plumbagina; Wang y Huang (2005a, b)
<b>Poaceae</b>			
<i>Cymbopogon citratus</i>	Té limón		Aceite esencial; Bergonzelli <i>et al.</i> (2003), Ohno <i>et al.</i> (2003)
<i>Setaria palmifolia</i>	—	► Planta completa (etanol); Wang y Huang (2005a)	
<b>Polygonaceae</b>			
<i>Polygonum chinense</i>	—	► Raíz (etanol); Wang y Huang (2005a)	
<i>Polygonum senticosum</i>	—	► Planta completa (etanol); Wang y Huang (2005a)	
<i>Polygonum tinctorium</i>	Indico japonés		Alcaloides y flavonoides; Kataoka <i>et al.</i> (2001), Hashimoto <i>et al.</i> (1999)

PLANTAS CON ACTIVIDAD ANTI-*HELICOBACTER PYLORI*

Familia y nombre científico	Nombre común	Parte probada	Grupos químicos identificados
<i>Rheum emodi</i>	Ruibarbo del Himalaya	► Rizomas (agua); Ibrahim <i>et al.</i> (2006)	
<i>Rheum palmatum</i>	Ruibarbo de china	▲ Rizoma (agua); Bae <i>et al.</i> (1998)	
<b>Polyporaceae</b>			
<i>Poria cocos</i>	Poria	► — (agua); Bae <i>et al.</i> (1998) ► Raíz (etanol y agua); Li <i>et al.</i> (2005)	
<b>Primulaceae</b>			
<i>Lysimachia christinae</i>	Jin qian cao	▲ Planta completa (etanol); Li <i>et al.</i> (2005)	
<b>Ranunculaceae</b>			
<i>Cimicifuga heracleifolia</i>	Bugbane	► Rizoma (agua); Bae <i>et al.</i> (1998)	
<i>Coptidis japonica</i>	Ohren	▲ Rizoma (agua); Bae <i>et al.</i> (1998)	Alcaloide; Bae <i>et al.</i> (1998)
<i>Hydrastis canadensis</i>	Cúrcuma canadiense	▲ Rizoma (metanol); Mahady <i>et al.</i> (2003a)	Alcaloides; Mahady <i>et al.</i> (2003a)
<i>Nigella sativa</i>	Neguilla	▲ Semilla (agua); O'Mahony <i>et al.</i> (2005)	
<i>Paeonia albiflora</i>	Peonia china	► Raíz (agua); Bae <i>et al.</i> (1998)	
<i>Paeonia montana</i>	Peonia	► Corteza (agua); Bae <i>et al.</i> (1998)	
<b>Rosaceae</b>			
<i>Agrimonia pilosa</i>	Agrimonia china	► Planta completa (etanol); Wang y Huang (2005a)	Taninos; Funatogawa <i>et al.</i> (2004)
<i>Cowania mexicana</i>	Chivatillo		Taninos; Funatogawa <i>et al.</i> (2004)
<i>Eriobotrya japonica</i>	Níspero		Terpeno; Funatogawa <i>et al.</i> (2004)
<i>Fragaria</i> spp.	Fresa	▲ Fruto (—); Chatterjee <i>et al.</i> (2004)	
<i>Malus sylvestris</i>	Manzana		Protocianidinas; Funatogawa <i>et al.</i> (2004)
<i>Prunus armeniaca</i>	Chabacano	► Semilla (agua); Bae <i>et al.</i> (1998)	
<i>Prunus avium</i>	Cerezo	▲ Pedúnculo (agua y etanol); Nostro <i>et al.</i> (2005)	
<i>Prunus mume</i>	Chabacano japonés	▲ Jugo del fruto; Otsuka <i>et al.</i> (2005)	Siringaresinol; Miyazawa <i>et al.</i> (2006)
<i>Rosa rugosa</i>	Rosa de ramanas		Taninos; Funatogawa <i>et al.</i> (2004)
<i>Rubus idaeus</i>	Frambuesa	▲ Fruto (—); Chatterjee <i>et al.</i> (2004)	
<b>Rubiaceae</b>			
<i>Gardenia jasminoides</i>	Gardenia	► Fruto (agua); Bae <i>et al.</i> (1998)	
<i>Paederia scandens</i>	—	▲ Planta completa; Wang y Huang (2005a)	
<b>Rutaceae</b>			
<i>Aegle marmelos</i> ●	Membrillo de Bengala	► Raíz (agua); O'Mahony <i>et al.</i> (2005)	Ácido cinámico; Epifano <i>et al.</i> (2006)
<i>Boronia pinnata</i>			Ácido boropínico; Epifano <i>et al.</i> (2006)
<i>Citrus aurantium</i> ●	Naranja amargo	► Fruto (agua); Bae <i>et al.</i> (1998)	Aceite esencial; Bergonzelli <i>et al.</i> (2003)
<i>Citrus limonum</i>	Limón		Aceite esencial; Bergonzelli <i>et al.</i> (2003)

Familia y nombre científico	Nombre común	Parte probada	Grupos químicos identificados
<i>Citrus × paradisi</i>	Toronja		Aceite esencial; Bergonzelli <i>et al.</i> (2003)
<i>Citrus reticulata</i> <i>Citrus sinensis</i>	Mandarina	▲ Cáscara del fruto (etanol); Li <i>et al.</i> (2005)	Ácido cinámico; Epifano <i>et al.</i> (2006)
<i>Citrus sudachi</i>	Sudachi, limón	▲ Cáscara (metanol); Nakagawa <i>et al.</i> (2006)	Sudachitina; Nakagawa <i>et al.</i> (2006)
<i>Evodiae rutaecarpa</i>	Gosyuyu	▲ Fruto (metanol); Rho <i>et al.</i> (1999) ▲ Fruto (metanol) (éter de petróleo); Hamasaki <i>et al.</i> (2000)	Quinolonas; Tominaga <i>et al.</i> (2002), Hamasaki <i>et al.</i> (2000), Rho <i>et al.</i> (1999)
<i>Phellodendron amurense</i> ● <i>Poncirus trifoliata</i>	Árbol de Amur Naranja trifoliado	▲ Corteza (agua); Bae <i>et al.</i> (1998) ► Fruto (agua); Bae <i>et al.</i> (1998)	Flavonoides; Kim <i>et al.</i> (1999), Bae <i>et al.</i> (1999)
<i>Zanthoxylum nitidum</i>	—	► Raíz (etanol); Wang y Huang (2005a)	
<b>Santalaceae</b>			
<i>Santalum album</i> ●	Sándalo		Terpenos; Ochi <i>et al.</i> (2005)
<b>Sapindaceae</b>			
<i>Sapindus mukorossi</i>	Ritha, aritha	► Pericarpio del fruto (agua); Ibrahim <i>et al.</i> (2006)	
<b>Saururaceae</b>			
<i>Houttuynia cordata</i>	Planta camaleón	► Planta completa (etanol); Wang y Huang (2005a)	
<b>Scrophulariaceae</b>			
<i>Bacopa monnieri</i>	Rasayana	▲ Planta completa (metanol); Goel <i>et al.</i> (2003)	
<b>Simaroubaceae</b>			
<i>Harrisonia abyssinica</i>	—	▲ Raíz (metanol); Fabry <i>et al.</i> (1996a)	
<b>Solanaceae</b>			
<i>Capsicum</i> (género) ●	Chile		Capsaicina; Jones <i>et al.</i> (1997)
<i>Capsicum annuum</i>	Chile	▲ Fruto (agua); O'Mahony <i>et al.</i> (2005) ► Fruto (varios); Motohashi <i>et al.</i> (2003)	Flavonoide; Chung <i>et al.</i> (2001) Diterpeno; De Marino <i>et al.</i> (2006)
<i>Lycium chinense</i> <i>Solanum nigrum</i>	— Hierba mora	▲ Fruto (agua); Bae <i>et al.</i> (1998) ► Planta completa (etanol); Wang y Huang (2005a)	
<i>Solanum surattense</i>	Ela battu (Nightshade)	► Fruto y raíz (agua); O'Mahony <i>et al.</i> (2005)	
<i>Solanum xanthocarpum</i>	Katu val batu	▲ Planta completa; O'Mahony <i>et al.</i> (2005)	
<b>Sterculiaceae</b>			
<i>Theobroma cacao</i>	Cacao		Protocianidinas; Funatogawa <i>et al.</i> (2004)
<b>Theaceae</b>			
<i>Camellia sinensis</i> ●	Té negro, té verde	► Hojas (agua); O'Mahony <i>et al.</i> (2005) ▲ Té de catequinas; Imai <i>et al.</i> (2001)	Flavonoides; Mabe <i>et al.</i> (1999), Yee <i>et al.</i> (2000), Funatogawa <i>et al.</i> (2004)

PLANTAS CON ACTIVIDAD ANTI-*HELICOBACTER PYLORI*

Familia y nombre científico	Nombre común	Parte probada	Grupos químicos identificados
<i>Camelia japonica</i>	—		Taninos; Funatogawa <i>et al.</i> (2004)
<i>Thea chinensis</i>	—	► Hojas (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<b>Tiliaceae</b>			
<i>Tilia platyphyllos</i>	Tilo de hojas grandes	► Flores (agua y etanol); Nostro <i>et al.</i> (2005)	
<i>Tilia tomentosa</i>	Tilo plateado	► Flores (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<b>Trichocolaceae</b>			
<i>Trichocolea lanata</i>	—		Ácido cinámico; Epifano <i>et al.</i> (2006)
<b>Urticaceae</b>			
<i>Pouzolzia pentandra</i>	—	▲ Hoja (metanol); Bhamaraprevati <i>et al.</i> (2003)	
<b>Verbenaceae</b>			
<i>Lippia citriodora</i>	Cedrón	► Hojas (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	Aceite esencial; Bergonzelli <i>et al.</i> (2003); Ohno <i>et al.</i> (2003)
<i>Phyla nodiflora</i>	Falso tymo	► Planta completa (etanol); Wang y Huang (2005a)	
<i>Vitex rotundifolia</i>	Kolokolo	▲ Fruto; Bae <i>et al.</i> (1998)	
<b>Violaceae</b>			
<i>Viola mandshurica</i>	Sumire	► Planta completa (etanol); Wang y Huang (2005a)	
<b>Vitaceae</b>			
<i>Cayratia japonica</i>	Arbusto mortal	► Planta completa (etanol); Wang y Huang (2005a)	
<i>Vitis vinifera</i>	Semilla de uva		Protocianidinas; Funatogawa <i>et al.</i> (2004)
<i>Alpinia speciosa</i> ●	Planta de concha	▲ Raíz (etanol); Wang y Huang (2005a)	
<b>Zingiberaceae</b>			
<i>Amomum villosum</i> ●	—	▲ Fruto (etanol); Li <i>et al.</i> (2005)	
<i>Amomum xanthioides</i>	—	► Semilla (agua); Bae <i>et al.</i> (1998)	
<i>Curcuma longa</i> ●	Azafrán	▲ Rizoma (metanol); Mahady <i>et al.</i> (2002) ▲ Rizoma (agua); O'Mahony <i>et al.</i> (2005) ▲ Rizoma (metanol); Mahady <i>et al.</i> (2005)	Polifenol; Mahady <i>et al.</i> (2002)
<i>Elettaria cardamomum</i>	Cardamomo	▲ Semilla (etanol); Imai <i>et al.</i> (2001), Nostro <i>et al.</i> (2005) ▲ Semillas (metanol); Mahady <i>et al.</i> (2005)	
<i>Kaempferia galanga</i>	Galanga	▲ Rizoma (metanol); Bhamaraprevati <i>et al.</i> (2003)	
<i>Larrea divaricata</i>	Jarilla	► Hoja y ramas blandas (agua); Stege <i>et al.</i> (2006)	
<i>Zingiber officinale</i> ●	Gengibre	► Rizoma (agua); Bae <i>et al.</i> (1998) ▲ Rizoma (metanol); Mahady <i>et al.</i> (2003b) ▲ Rizoma (agua); O'Mahony <i>et al.</i> (2005) ▲ Rizoma (agua y etanol); Nostro <i>et al.</i> (2005) ▲ Rizoma (metanol); Mahady <i>et al.</i> (2005) ▲ Rizoma (etanol); Nostro <i>et al.</i> (2006)	Polifenol; Mahady <i>et al.</i> (2003b)

PLANTAS CON ACTIVIDAD ANTI-*HELICOBACTER PYLORI*

Familia y nombre científico	Nombre común	Parte probada	Grupos químicos identificados
<b>Araceae</b> <i>Pinellia ternata</i>	Pinellia	► Tubérculo (agua); Bae <i>et al.</i> (1998)	
<b>Araliaceae</b> <i>Panax ginseng</i> ●	Ginseng	► Raíz (agua); Bae <i>et al.</i> (1998) ◆ Raíz (agua); Lee J.H. <i>et al.</i> (2004)	Poliacetilenos y azúcares; Bae <i>et al.</i> (2001a), Belogortseva <i>et al.</i> (2000)
<i>Aralia cordata</i>	Nardo japonés	► Raíz (agua); Bae <i>et al.</i> (1998)	
<b>Areceaceae</b> <i>Areca catechu</i> ●	Areca, betel	► Semilla (etanol); Wang y Huang (2005a)	
<b>Aristolochiaceae</b> <i>Aristolochia debilis</i> <i>Aristolochia mallisima</i> <i>Aristolochia paucinervis</i>	Ma dou ling — Candil	► Raíz (etanol); Li <i>et al.</i> (2005) ► Hoja (etanol y agua); Li <i>et al.</i> (2005) ▲ Hoja seca y rizoma (metanol y hexano); Gadhi <i>et al.</i> (2001)	
<b>Asteraceae</b> <i>Achillea ligustica</i> <i>Achillea millefolium</i> <i>Anthemis altísima</i>	Mil hojas de ligur Mil en rama Manzanilla altísima	► Parte aérea (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003) ▲ Parte aérea (metanol); Mahady <i>et al.</i> (2005)	Flavonoides, terpenos, fenoles; Beil <i>et al.</i> (1995), Konstantinopoulou <i>et al.</i> (2003)
<i>Anthemis chia</i> <i>Anthemis melanolepis</i> <i>Anthemis tinctoria</i> <i>Anthemis tomentosa</i> <i>Artemisia argvi</i> <i>Anthriscus sylvestris</i> <i>Artemisia capillaris</i> <i>Artemisia dracunculus</i>	Manzanilla olorosa Manzanilla Manzanilla amarilla Manzanilla — Mirra Yin chen hao Tarragón	► Parte aérea (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003) ▲ — (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003) ► Parte aérea (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003) ► Flor y hoja (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003) ► Tallo y hoja (etanol); Wang y Huang (2005a) ► Raíz (agua); Bae <i>et al.</i> (1998) ► Planta completa (agua); Bae <i>et al.</i> (1998) ◆ — (—); Lee J.H. <i>et al.</i> (2004) ▲ Hoja (agua); O'Mahony <i>et al.</i> (2005)	Aceite esencial; Bergonzelli <i>et al.</i> (2003)
<i>Atractylodes japonica</i> ● <i>Bidens bipinnata</i> <i>Bidens pilosa</i> ● <i>Calendula officinalis</i> ● <i>Centaurea affinis</i> <i>Centaurea pelia</i> <i>Centaurea salonitana</i> ● <i>Centaurea solstitialis</i> ● <i>Centaurea spinosa</i>	Packchul Aguja española Aceitilla Mercadela — — — Cardo estrella amarilla Pincel	► Rizoma (agua); Bae <i>et al.</i> (1998) ► Planta completa (etanol); Wang y Huang (2005a) ► Tallo (etanol); Wang y Huang (2005a) ► Flor (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003) ► Parte aérea (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003) ▲ — (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003) ► Parte aérea (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003) ▲ Parte herbácea (metanol y agua); Yesilada <i>et al.</i> (1999) ► Parte aérea (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	

Familia y nombre científico	Nombre común	Parte probada	Grupos químicos identificados
<i>Centaurea thessala</i>	—	▲ — (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<i>Chamomilla recutita</i>	Manzanilla	▲ — (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<i>Chrysanthemum indicum</i>	—	► Flor (agua); Bae <i>et al.</i> (1998)	
<i>Cichorium intybus</i> ●	Achicoria común	▲ Raíz (Etanol); Nostro <i>et al.</i> (2005)	
<i>Conyza albida</i>	Cimonillo	▲ — (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<i>Conyza bonariensis</i>	Rama negra	▲ — (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<i>Cynara scolymus</i>	Alcachofa	▲ Hojas (agua y etanol); Nostro <i>et al.</i> (2005)	
<i>Dittrichia viscosa</i>	Falsa cabeza amarilla	▲ — (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<i>Dittrichia graveolens</i>	Stinkwort	► Parte aérea (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<i>Entada abyssinica</i>	Umusange	► Corteza (metanol); Fabry <i>et al.</i> (1996a)	
<i>Gnaphalium adnatum</i>	—	► Planta completa (metanol); Wang y Huang (2005a)	
<i>Helichrysum stoechas</i>	Perpetua, siempreviva	► Parte aérea (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<i>Inula verbascifolia</i>	Inula	► Parte aérea (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<i>Inula viscosa</i>	Inula	▲ — (agua y etanol 95%); Tabak <i>et al.</i> (1996)	
<i>Matricaria aurea</i>	—	► — (agua y etanol 95%); Tabak <i>et al.</i> (1996)	
<i>Matricaria matricarioides</i>	Mala hierba de piña	► Flor (agua); Annuk <i>et al.</i> (1999)	
<i>Matricaria recutita</i>	Manzanilla alemana	► Flor (agua); Annuk <i>et al.</i> (1999) ► Flor (metanol); Mahady <i>et al.</i> (2005)	Aceite esencial; Bergonzelli <i>et al.</i> (2003)
<i>Phagnalon graecum</i>	Phagnalon	► Parte aérea (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<i>Saussurea lappa</i> ●	—	► Raíz (agua); Bae <i>et al.</i> (1998) ▲ Raíz (etanol); Li <i>et al.</i> (2005)	
<i>Senecio scandens</i>	Senecio	► Planta completa (etanol); Wang y Huang (2005a)	
<i>Senecio thapsoides</i>	Senecio	► Parte aérea (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<i>Sonchus arvensis</i>	Lechuguilla	► Planta completa (etanol); Wang y Huang (2005a)	
<i>Spilanthes mauritiana</i>	—	► Raíz (metanol); Fabry <i>et al.</i> (1996a)	
<i>Vernonia cinerea</i>	Chamorro	► Planta completa (etanol); Wang y Huang (2005a)	
<i>Wikstroemia indica</i>	—	► Corteza (etanol); Wang y Huang (2005a)	
<i>Xanthium brasilicum</i>	Cardillo	▲ Parte aérea (metanol); Nariman <i>et al.</i> (2004)	
<i>Xanthium sibiricum</i>	—	► Fruto (agua); Li <i>et al.</i> (2005)	
<i>Xanthium strumarium</i>	Cardillo	► Planta completa (etanol); Wang y Huang (2005)	
<b>Betulaceae</b>			
<i>Corylus heterophylla</i>	Avellana siberiana		Taninos; Funatogawa <i>et al.</i> (2004)
<b>Bignoniaceae</b>			
<i>Tabebuia impetiginosa</i>	Taheebo	► Corteza (metanol); Park <i>et al.</i> (2006)	Antro y naftoquinonas; Park <i>et al.</i> (2006)
<b>Bombacaceae</b>			
<i>Bombax malabaricum</i>	Árbol de algodón de seda roja	▲ Raíz (etanol 95%); Wang y Huang (2005a)	
<b>Boraginaceae</b>			
<i>Borago officinalis</i>	Borraja	▲ Flor (agua); O'Mahony <i>et al.</i> (2005)	

PLANTAS CON ACTIVIDAD ANTI-*HELICOBACTER PYLORI*

Familia y nombre científico	Nombre común	Parte probada	Grupos químicos identificados
<i>Ehretia acuminata</i> <i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Árbol de kodo Mijo	► Raíz (etanol); Wang y Huang (2005a) ► Raíz (agua); Bae <i>et al.</i> (1998)	
<b>Brassicaceae</b> <i>Brassica oleracea</i> ●	Brócoli		Sulforofano; Fahey <i>et al.</i> (2002), Haristoy <i>et al.</i> (2003)
<i>Wasabia japonica</i>	Wasabi	▲ Raíz, corteza y hoja (éter anhidro); Shin <i>et al.</i> (2004)	
<b>Burseraceae</b> <i>Canarium album</i>	Olivo blanco	► Raíz (etanol); Wang y Huang (2005a)	
<b>Campanulaceae</b> <i>Platycodon grandiflorum</i>	Flor de globo	► Raíz (agua); Bae <i>et al.</i> (1998)	
<b>Cannabaceae</b> <i>Humulus lupulus</i>	Lúpulo	► Flor (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<b>Capparaceae</b> <i>Cleome viscosa</i>	Frijol cimarrón	▲ Hoja (metanol); Bhamaraprevati <i>et al.</i> (2003)	
<b>Caprifoliaceae</b> <i>Lonicera japonica</i> <i>Sambucus canadensis</i> <i>Sambucus chinensis</i> <i>Sambucus ebulus</i>	Madreselva japonesa Baya de sauco Saucu chino Matapulgas, sauquillo	► Flor (agua); Bae <i>et al.</i> (1998) ▲ Fruto (—); Chatterjee <i>et al.</i> (2004) ► Planta completa (etanol); Wang y Huang (2005a) ► Parte herbácea (agua y metanol); Yesilada <i>et al.</i> (1999)	
<b>Caryophyllaceae</b> <i>Cerastium candidissimum</i> <i>Herniaria incana</i>	Oreja de ratón plateada —	▲ — (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003) ► Parte aérea (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<b>Casuarinaceae</b> <i>Casuarina stricta</i>	Casuarina		Taninos; Funatogawa <i>et al.</i> (2004)
<b>Chenopodiaceae</b> <i>Chenopodium ambrosioides</i>	Epazote	► Tallo y hoja (etanol); Wang y Huang (2005a)	
<b>Cistaceae</b> <i>Cistus creticus</i> <i>Cistus ladanigerus</i> <i>Cistus laurifolius</i> ● <i>Cistus monspeliensis</i>	Estepa menorquina Cistus Estepa real Jaguarzo negro	► Flor y hoja (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003) ▲ Flor (metanol); Yesilada <i>et al.</i> (1999) ► Flor y hoja (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	Aceite esencial; Bergonzelli <i>et al.</i> (2003) Flavonoides; Ustun <i>et al.</i> (2006)



Familia y nombre científico	Nombre común	Parte probada	Grupos químicos identificados
<i>Cistus parviflorus</i>	Rosa de roca	► Flor y hoja (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<i>Cistus salvifolius</i>	Rosa de roca	► Flor y hoja (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<b>Clusiaceae</b>			
<i>Hypericum amblycalyx</i>	—	► Parte aérea (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<i>Hypericum perforatum</i>	Hierba de San Juan	▲ Flor (metanol); Yesilada <i>et al.</i> (1999)	
<b>Combretaceae</b>			
<i>Pteleopsis suberosa</i> ●	—	▲ Corteza (metanol y agua); Germano <i>et al.</i> (1998), De Pasquale <i>et al.</i> (1995)	Saponinas triterpénicas; De Leo <i>et al.</i> (2006)
<i>Terminalia chebula</i>	Myrobalan negro	▲ Corteza (metanol y agua); Malekzadeh <i>et al.</i> (2001)	
<i>Terminalia spinosa</i>	—	▲ Ramas superiores (metanol); Fabry <i>et al.</i> (1996a) ▲ Corteza (metanol); Fabry <i>et al.</i> (1996b)	
<b>Commelinaceae</b>			
<i>Murdannia bracteata</i>	—	► Planta completa (metanol); Wang y Huang (2005a)	
<b>Cornaceae</b>			
<i>Cornus officinalis</i>	Shan zhu yu		Taninos; Funatogawa <i>et al.</i> (2004)
<b>Cucurbitaceae</b>			
<i>Momordica charantia</i>	Melón amargo	▲ Fruto (metanol); Yesilada <i>et al.</i> (1999)	
<b>Cupressaceae</b>			
<i>Cupressus sempervirens</i>	Ciprés		Aceite esencial; Bergonzelli <i>et al.</i> (2003)
<i>Juniperus communis</i>	Enebro común	▲ Fruto (etanol); Nostro <i>et al.</i> (2005) ▲ Fruto (metanol); Mahady <i>et al.</i> (2005)	Aceite esencial; Bergonzelli <i>et al.</i> (2003) Terpeno; Nakanishi <i>et al.</i> (2005)
<b>Cycadaceae</b>			
<i>Cycas resoluta</i>	Palma de sago	► Hoja (etanol); Wang y Huang (2005a)	
<i>Cycas siamensis</i>	—	▲ Hoja (metanol); Bhamaraprevati <i>et al.</i> (2003)	
<b>Cyperaceae</b>			
<i>Cyperus rotundus</i>	Coyolillo, coquito	▲ Rizoma (agua); Bae <i>et al.</i> (1998)	
<b>Ebenaceae</b>			
<i>Diospyros kaki</i>	Manzana del oriente	► Cáscara (diversas); Kawase <i>et al.</i> (2003)	
<b>Elaeagnaceae</b>			
<i>Elaeagnus umbellata</i>	Aceituna del otoño		Taninos; Yoshida <i>et al.</i> (2000), Funatogawa <i>et al.</i> (2004)
<i>Hippophae rhamnoides</i>	Espino marino	▲ Hoja (etanol); Li <i>et al.</i> (2005)	Tanino; Funatogawa <i>et al.</i> (2004)

PLANTAS CON ACTIVIDAD ANTI-*HELICOBACTER PYLORI*

Familia y nombre científico	Nombre común	Parte probada	Grupos químicos identificados
<b>Ericaceae</b>			
<i>Arctostaphylos uva-ursi</i>	Manzanita	▲ Hoja (agua); Annuk <i>et al.</i> (1999) ▲ Fruto (—); Chatterjee <i>et al.</i> (2004)	
<i>Vaccinium vitis-idaea</i>	Cereza negra	▲ Hoja (agua); Annuk <i>et al.</i> (1999) ▲ Fruto (—); Chatterjee <i>et al.</i> (2004)	
<i>Vaccinium macrocarpon</i>	Arándano agrio	◆ — (—); Burger <i>et al.</i> (2000) ▲ Fruto (—); Chatterjee <i>et al.</i> (2004) ▲ — (—); Lin <i>et al.</i> (2005)	
<i>Vaccinium myrtillus</i>	Arándano	▲ Fruto (—); Chatterjee <i>et al.</i> (2004)	
<i>Vaccinium uliginosum</i>	Arándano	▲ Fruto (—); Chatterjee <i>et al.</i> (2004)	
<b>Euphorbiaceae</b>			
<i>Bischofia javanica</i>	Toog	► Tallo (etanol); Wang y Huang (2005a)	
<i>Croton lechleri</i>	Sangre de grado	▲ Látex y productos comerciales; Ortiz <i>et al.</i> (2003), Tran <i>et al.</i> (2006)	
<i>Croton sublyratus</i> ●	Croton, plaunoi		Plaunotol; Koga <i>et al.</i> (1996), Koga <i>et al.</i> (2002), Takagi <i>et al.</i> (2000)
<i>Euphorbia hirta</i>	Hierba de la golondrina	► Planta completa (etanol); Wang y Huang (2005a)	Taninos; Funatogawa <i>et al.</i> (2004)
<i>Phyllanthus urinaria</i>	—	► Planta completa (etanol); Wang y Huang (2005a)	
<b>Fabaceae</b>			
<i>Abrus cantoniensis</i>	—	▲ Hoja (metanol); Li <i>et al.</i> (2005)	
<i>Astragalus membranaceus</i> ●	Astrágalo chino	► Raíz (etanol); Li <i>et al.</i> (2005) ► Raíz (agua); Bae <i>et al.</i> (1998)	
<i>Cassia grandis</i>	Carao, lluvia rosa	▲ Hoja (metanol); Bhamarapavati <i>et al.</i> (2003)	
<i>Cassia obtusifolia</i>	Vaina o capullo de oz	▲ Hojas (agua); Li <i>et al.</i> (2005) ► Semilla (agua); Bae <i>et al.</i> (1998)	
<i>Derris malaccensis</i>	Enredadera de Nueva Guinea		Rotenoides; Takashima <i>et al.</i> (2002), Isobe <i>et al.</i> (2002)
<i>Dorycnium pentaphyllum</i>	Bocha, socarrillo	► Parte aérea (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<i>Flemingia philippinensis</i>	—	► Tallo (etanol); Wang y Huang (2005a)	
<i>Glycyrrhiza aspera</i> ●	Orozús	▲ Parte aérea (mezcla); Nariman <i>et al.</i> (2004)	
<i>Glycyrrhiza glabra</i> ●	Orozús	▲ — (agua y etanol); Tabak <i>et al.</i> (1996) ▲ Raíz (orozús); Krausse <i>et al.</i> (2004) ▲ Tallo (agua); O'Mahony <i>et al.</i> (2005)	Flavonoides y saponinas; Fukai <i>et al.</i> (2002), Krausse <i>et al.</i> (2004)
<i>Glycyrrhiza Inflata</i> ●	Orozús		Flavonoides; Fukai <i>et al.</i> (2002)
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> ●	Orozús	► Raíz (agua); Bae <i>et al.</i> (1998) ► Rizoma (etanol y agua); Li <i>et al.</i> (2005) ► Raíz (agua); Bae <i>et al.</i> (1998)	Flavonoides y saponinas; Fukai <i>et al.</i> (2002)
<i>Myroxylon peruiiferum</i>	Bálsamo de Perú		Flavonoides; Ohsaki <i>et al.</i> (1999)
<i>Pueraria thunbergiana</i>	Kudzu	► Raíz (agua); Bae <i>et al.</i> (1998)	Flavonoides; Bae <i>et al.</i> (2001b)
<i>Sophora flavescens</i> ●	Ku shen	► Raíz (etanol); Wang y Huang (2005a) ► Raíz (etanol y agua); Li <i>et al.</i> (2005)	
<i>Spartium junceum</i> ●	Retama de olor	► Flor (agua y metanol); Yesilada <i>et al.</i> (1999)	
<i>Trigonella foenum graecum</i>	Alhova	► Semilla (etanol y agua); Li <i>et al.</i> (2005) ► Semilla (agua); O'Mahony <i>et al.</i> (2005)	

Familia y nombre científico	Nombre común	Parte probada	Grupos químicos identificados
<b>Fagaceae</b> <i>Quercus aliena</i>	Roble blanco oriental		Tanino; Funatogawa <i>et al.</i> (2004)
<b>Fumariaceae</b> <i>Corydalis yanhusuo</i>	Yan hu suo	▲ Tallo (etanol); Li <i>et al.</i> (2005)	
<b>Gentianaceae</b> <i>Gentiana lutea</i>	Flor de hielo	▲ Raíz (metanol); Mahady <i>et al.</i> (2005)	
<b>Geraniaceae</b> <i>Geranium thunbergii</i>	Geranio		Taninos; Funatogawa <i>et al.</i> (2004)
<b>Ginkgoaceae</b> <i>Ginkgo biloba</i>	Ginkgo	► Hoja (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003) ► Hoja (metanol); Mahady <i>et al.</i> (2005)	
<b>Gramineae</b> <i>Hordeum vulgare</i>	Cebada	▲ Semilla (acuoso); Bae <i>et al.</i> (1998)	
<b>Grossulariaceae</b> <i>Ribes nigrum</i>	Grosella negra	► ◆ Semillas (acetona); Lengsfeld <i>et al.</i> (2004a)	
<b>Juglandaceae</b> <i>Juglans regia</i>	Nogal	▲ Parte aérea (mezcla); Nariman <i>et al.</i> (2004)	
<b>Labiatae</b> <i>Perilla sikokiana</i>	—	► Parte herbácea (agua); Bae <i>et al.</i> (1998)	
<b>Lamiaceae</b> <i>Acinos suaveolens</i>	—	► Flor y hoja (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<i>Anisomeles indica</i>	Fang feng cao	▲ Tallo (etanol 95%); Wang y Huang (2005a)	
<i>Coridothymus capitatus</i>	Timo	▲ — (agua); Tabak <i>et al.</i> (1996)	
<i>Hyptis fasciculata</i>	—	▲ Partes aéreas (—); Isobe <i>et al.</i> (2006)	Flavonoides; Isobe <i>et al.</i> (2006)
<i>Lavandula angustifolia</i>	Lavanda	▲ Flor (metanol); Mahady <i>et al.</i> (2005)	
<i>Majorana syrica</i>	Zaatar	▲ — (agua y etanol 95%); Tabak <i>et al.</i> (1996)	
<i>Melissa officinalis</i>	Melisa, toronjil, cedrón	▲ — (agua y etanol 95%); Tabak <i>et al.</i> (1996) ► Flor (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003) ▲ Hoja (metanol); Mahady <i>et al.</i> (2005)	
<i>Mentha arvensis</i>	Menta japonesa	▲ Planta completa; Bae <i>et al.</i> (1998)	
<i>Mentha haplocalyx</i>	Menta china	► Parte aérea (etanol); Li <i>et al.</i> (2005)	
<i>Mentha × piperita</i>	Hierbabuena	► Hoja (agua y etanol); Nostro <i>et al.</i> (2005) ▲ Hoja (metanol); Mahady <i>et al.</i> (2005)	Aceites esenciales; Imai <i>et al.</i> (2001), May <i>et al.</i> (2003)
<i>Mentha spica</i>	Menta		Aceites esenciales; Imai <i>et al.</i> (2001)
<i>Micromeria juliana</i>	Savory	► Hoja (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<i>Nepeta argolica</i>	—	► Parte aérea (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	Aceites esenciales; Kalpoutzakis <i>et al.</i> (2001)
<i>Nepeta camphorata</i>	—		Aceites esenciales; Kalpoutzakis <i>et al.</i> (2001)

PLANTAS CON ACTIVIDAD ANTI-*HELICOBACTER PYLORI*

Familia y nombre científico	Nombre común	Parte probada	Grupos químicos identificados
<i>Ocimum basilicum</i> ●	Albahaca	▲ — (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	Aceite esencial; Bergonzelli <i>et al.</i> (2003)
<i>Origanum dictamnus</i>	Orégano	▲ — (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<i>Origanum majorana</i>	Mejorana, mayorana	▲ — (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<i>Origanum vulgare</i>	Orégano	▲ Parte aérea (metanol); Mahady <i>et al.</i> (2005) ▲ — (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003) ▲ Hoja (agua); O'Mahony <i>et al.</i> (2005) ▲ Hoja (agua); Nostro <i>et al.</i> (2005) ▲ Hoja (metanol); Mahady <i>et al.</i> (2005), Preuss <i>et al.</i> (2005) ▲ — (agua); Lin <i>et al.</i> (2005)	Aceite esencial; Bergonzelli <i>et al.</i> (2003)
<i>Rabdosia trichocarpa</i>	—		Terpeno; Kadota <i>et al.</i> (1997)
<i>Rosmarinus officinalis</i> ●	Romero	► — (agua y etanol 95%); Tabak <i>et al.</i> (1996) ► Hoja (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003) ▲ Hoja (etanol); Nostro <i>et al.</i> (2005) ▲ Hoja (metanol); Mahady <i>et al.</i> (2005)	
<i>Salvia fruticosa</i>	Artemisa, salvia griega	► Parte aérea (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<i>Salvia officinalis</i>	Salvia	► — (agua y etanol 95%); Tabak <i>et al.</i> (1996) ▲ Hoja (agua); O'Mahony <i>et al.</i> (2005) ▲ Hoja (agua y etanol); Nostro <i>et al.</i> (2005) ▲ Hoja (metanol); Mahady <i>et al.</i> (2005)	Aceite esencial; Bergonzelli <i>et al.</i> (2003)
<i>Salvia pomifera</i>	Salvia manzana	► Parte aérea (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<i>Salvia sclarea</i>	Salvia		Aceite esencial; Bergonzelli <i>et al.</i> (2003)
<i>Satureja montana</i>	Ajedrea		Aceite esencial; Bergonzelli <i>et al.</i> (2003)
<i>Satureja parnassica</i>			Aceite esencial; Tzakou y Skaltsa (2003)
<i>Scutellaria albida</i>	—	► Parte aérea (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<i>Scutellaria baicalensis</i>	—	▲ Raíz (agua); Bae <i>et al.</i> (1998)	
<i>Scutellaria barbata</i>	—	► Planta completa (etanol y agua); Li <i>et al.</i> (2005)	
<i>Scutellaria sieberi</i>	—	► Parte aérea (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<i>Sideritis italica</i>	Pasto de montaña	▲ Parte aérea y flor (aceite esencial); Basile <i>et al.</i> (2006)	
<i>Stachys alopecurus</i>	—	▲ — (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<i>Stachys candida</i>	—	► Parte aérea (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<i>Stachys chrysantha</i>	—	► Hoja (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<i>Stachys cretica</i>	—	► Parte aérea (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<i>Stachys germanica</i>	—	► Flor y hoja (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<i>Stachys ionica</i>	—	► Parte aérea (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<i>Stachys menthifolia</i>	—	► Parte aérea (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<i>Stachys officinalis</i>	—	► Parte aérea (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<i>Stachys melangavica</i>	—	► Parte aérea (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	

Familia y nombre científico	Nombre común	Parte probada	Grupos químicos identificados
<i>Stachys scyronica</i>	—	► Parte aérea (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<i>Stachys argolica</i>	—	► Parte aérea (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<i>Teucrium flavum</i>	Tomillo	► Parte aérea (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<i>Thymus atticus</i>	Tomillo	► Parte aérea (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003)	
<i>Thymus citroidorus</i>	Tomillo	▲ — (agua y etanol 95%); Tabak <i>et al.</i> (1996)	
<i>Thymus kotschyanus</i>	Tomillo	▲ Raíz (mezcla de metanol/éter anhidro/benceno de petróleo); Nariman <i>et al.</i> (2004)	
<i>Thymus serpyllum</i>	Tomillo	▲ "TOP" (agua y etanol); Nostro <i>et al.</i> (2005)	
<i>Thymus vulgaris</i>	Tomillo	▲ — (agua y etanol 95%); Tabak <i>et al.</i> (1996)	Aceite esencial; Bergonzelli <i>et al.</i> (2003)
<i>Thymus zygis</i>	Tomillo rojo		Aceite esencial; Bergonzelli <i>et al.</i> (2003)
<b>Lauraceae</b>			
<i>Cinnamomum cassia</i> ●	Canela china	▲ Ramas pequeñas (agua); Bae <i>et al.</i> (1998) ▲ Corteza (etanol 95%); Tabak <i>et al.</i> (1999)	Cinamaldehído, eugenol; Tabak <i>et al.</i> (1999)
<i>Cinnamomum verum</i>	Canela de Ceilán	▲ Corteza (acuoso); O'Mahony <i>et al.</i> (2005)	
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Canela	▲ — (Agua y etanol 95%); Tabak <i>et al.</i> (1996) ▲ Corteza (etanol); Nostro <i>et al.</i> (2005)	Aceite esencial; Bergonzelli <i>et al.</i> (2003)
<i>Laurus nobilis</i> ●	Laurel	► — (agua y etanol 95%); Tabak <i>et al.</i> (1996) ► Hoja (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003) ▲ Hoja (metanol); Mahady <i>et al.</i> (2005)	
<i>Lindera strychnifolia</i>	Wu yao	► Raíz (etanol); Li <i>et al.</i> (2005)	
<i>Litsea cubeba</i>	Pimienta de la montaña	► Tallo (etanol); Wang y Huang (2005a)	
<i>Litsea elliptica</i>	Medang	▲ Hoja (metanol); Bhamarapavati <i>et al.</i> (2003)	
<i>Sassafras officinale</i>	Sassafras		Aceite esencial; Bergonzelli <i>et al.</i> (2003)
<b>Lecythidaceae</b>			
<i>Barringtonia acutangula</i>	Nuez cortada	▲ Hoja (metanol); Bhamarapavati <i>et al.</i> (2003)	
<b>Liliaceae</b>			
<i>Allium ascalonicum</i>	Ascalonia, ajo	▲ Hoja (metanol); Adeniyi-Anyiam (2004)	
<i>Allium sativum</i> ●	Ajo común	▲ Fruto (acetona, etanol); limuro <i>et al.</i> (2002) ► Bulbo (agua); O'Mahony <i>et al.</i> (2005) ► Fruto (agua y etanol); Tabak <i>et al.</i> (1996)	Tiosulfonatos; (Referencias en el texto)
<i>Aloe vera</i> ●	Sávila	◆ — (—); Prabhjone <i>et al.</i> (2006)	
<i>Fritillaria thunbergii</i>	Zhe bei mu	► Bulbo (agua); Bae <i>et al.</i> (1998) ▲ Tallo (agua y etanol); Li <i>et al.</i> (2005)	
<i>Liriope platyphylla</i>	—	► Tubérculo (agua); Bae <i>et al.</i> (1998)	
<i>Veratrum</i> (género)	Ballestera		Alcaloides; Tezuka <i>et al.</i> (1999)
<b>Lithraceae</b>			
<i>Lafoensia pacari</i>	Mangava-brava	► — (metanol); Da Mota <i>et al.</i> (2006)	
<b>Magnoliaceae</b>			
<i>Illicium verum</i>	Anís estrella	► Fruto (metanol 70%); Stamatis <i>et al.</i> (2003) ▲ Fruto (metanol); Mahady <i>et al.</i> (2005)	
<i>Magnolia officinalis</i>	Magnolia china	▲ Corteza (agua); Bae <i>et al.</i> (1998) ▲ Tallo (etanol); Li <i>et al.</i> (2005)	Magnolol; Bae <i>et al.</i> (1998)



## Ethnopharmacological communication

Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disordersIsrael Castillo-Juárez<sup>a</sup>, Violeta González<sup>a</sup>, Héctor Jaime-Aguilar<sup>a</sup>, Gisela Martínez<sup>a</sup>, Edelmira Linares<sup>b</sup>, Robert Bye<sup>b</sup>, Irma Romero<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, México, D.F., Mexico  
<sup>b</sup> Jardín Botánico, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, México, D.F., Mexico

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 14 October 2008

Received in revised form 2 December 2008

Accepted 21 December 2008

Available online 27 December 2008

## Keywords:

*Helicobacter pylori*

Antibacterial activity

Mexican medicinal plants

Gastritis

Aqueous extract

Methanol extract

## ABSTRACT

**Aim of the study:** *Helicobacter pylori* is the major etiological agent of chronic active gastritis and peptic ulcer disease and is linked to gastric carcinoma. Treatment to eradicate the bacteria failed in many cases, mainly due to antibiotic resistance, hence the necessity of developing better therapeutic regimens. Mexico has an enormous unexplored potential of medicinal plants. This work evaluates the *in vitro* anti-*H. pylori* activity of 53 plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders.

**Materials and methods:** To test the *in vitro* antibacterial activity, agar dilution and broth dilution methods were used for aqueous and methanolic extracts, respectively.

**Results:** Aqueous extracts of *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana*, *Cuphea aequipetala*, *Ludwigia repens*, and *Mentha × piperita* (MIC 125 to <250 µg/ml) as well as methanolic extracts of *Persea americana*, *Annona cherimola*, *Guaiaacum coulteri*, and *Moussonia depepeana* (MIC <7.5 to 15.6 µg/ml) showed the highest inhibitory effect.

**Conclusions:** The results contribute to understanding the mode of action of the studied medicinal plants and for detecting plants with high anti-*Helicobacter pylori* activity.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

The Gram-negative bacterium *Helicobacter pylori* is the most important etiological agent of chronic active type B gastritis and peptic ulcer diseases, and is linked to gastric carcinoma (Atherton, 2006). The prevalence of *Helicobacter pylori* is about 40% in developed countries and 80–90% in the developing world (Perez-Perez et al., 2004). Once acquired, *Helicobacter pylori* infection usually persists for life unless treated by antimicrobial therapy.

The conventional eradication triple therapy combines two antibiotics and a proton pump inhibitor. The success rate following this therapy is approximately 80% and is constantly decreasing worldwide, mainly due to the antibiotic resistance (Wolle and Malfertheiner, 2007). However, these therapies involve taking too many drugs, which may cause side effects that, in addition to significant cost of the treatment, promote insufficient patient compliance. These factors, together with antibiotic resistance, indicate the need to find new anti-*Helicobacter pylori* treatments.

Mexico is one of the five Megadiverse countries of the world given that about 50% of the 22,000 vascular plant species are

endemic (Villaseñor, 2004). Over 3000 of these plants are used medicinally (Bye et al., 1995). About one-third of these plants are employed in the treatment of a variety of ailments associated with the gastrointestinal system (Argueta et al., 1994).

In recent years the studies regarding the anti-*Helicobacter pylori* activity of medicinal plants have increased considerably. Nevertheless, only one work has evaluated the anti-*Helicobacter pylori* activity of some Mexican medicinal plants and that focused on Yucatán, México (Ankli et al., 2002). Taking into account the enormous potential of Mexican medicinal flora, the aim of this study is to evaluate the *in vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of 53 plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal illness.

## 2. Materials and methods

## 2.1. Plant material

Plants were selected based on ethnobotanical studies made in Mexico. The plants were obtained commercially or collected from different parts of the country and were identified. Voucher specimens were deposited in the National Herbarium of Mexico (MEXU) of the National Autonomous University of Mexico. The list of plants used and other valuable information is found in Table 1.

\* Corresponding author. Tel.: +52 55 56232511; fax: +52 55 56162419.  
E-mail address: [irma@bq.unam.mx](mailto:irma@bq.unam.mx) (I. Romero).

**Table 1**  
Anti-*Helicobacter pylori* activity of aqueous extracts (AE) and methanol extracts (ME) of Mexican medicinal plants.

Botanical species scientific name (Family)	Common name <sup>a</sup>	Folk usage <sup>b</sup>	Plant part used <sup>c</sup>	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )		Yield (%)		Voucher number
				AE	ME	AE	ME	
<i>Dianthus caryophyllus</i> L. (Caryophyllaceae)	Clavel	DD	AP	>1000	>500	1.8	0.8	1211828
<i>Equisetum myriochaetum</i> Schlecht. & Cham. (Equisetaceae)	Cola de caballo	U, G, SA, DE	AP	>1000	>500	1.7	0.8	2303
<i>Toxodim mucronatum</i> Ten. (Taxodiaceae)	Ahuehete	DI	L/B	>1000	>500	6.4	0.4	1211841
<i>Hibiscus subdarffia</i> L. (Malvaceae)	Flor de Jamaica	SA, DD	F	>1000	>500	18.2	17.7	1492
<i>Hemiogramma excelsum</i> (Kunth) A.C. Sm. (Hippocrateaceae)	Cancerina (GC)	G, U, SA	R/B	>1000	>500	5.2	4.4	1549
<i>Teloxys ambrasioides</i> (L.) W.A. Weber (Chenopodiaceae)	Epazote morado	SA, DI, PA	AP	>1000	500	0.7	1.7	1201177
<i>Anoda cristata</i> (L.) Schldl. (Malvaceae)	Alaches	SA	L/S	>1000	500	1.8	2.9	1222018
<i>Polygonum longiflorum</i> A. Gray (Lamiaceae)	Orégano (NLM/NCM)	II, PA	L/S	>1000	250	10.3	8.0	1502
<i>Quercus rugosa</i> Née (Fagaceae)	Escino	II, SC, DI	L	>1000	125	0.7	2.2	1211827
<i>Haplopygium spinulosum</i> (Pursh) DC. (Asteraceae)	Árnica Blanca	II	AP	>1000	125	4.6	3.1	1204422
<i>Capella bursa-pastoris</i> (L.) Medik. (Brassicaceae)	Bolsa de Pastor	U	AP	>1000	62.5	3.7	0.3	1211823
<i>Tanacetum parthenium</i> (L.) Sch. Bip. (Asteraceae)	Santa María	SA	AP	>1000	62.5	2.1	3.5	1201179
<i>Machaeranthera cf. parviflora</i> A. Gray (Asteraceae)	Árnica morada	DD	AP	>1000	31.2	4.2	2.4	1204424
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf (Poaceae)	Te limón	SA	L	>1000	31.2	1.7	3.7	1201181
<i>Ocimum basilicum</i> L. (Lamiaceae)	Albaliaca	SA, D, PA, DI	AP	>1000	31.2	9.8	2.0	1211816
<i>Marrubium vulgare</i> L. (Lamiaceae)	Marrubio	SA, DI, G	L/S	>1000	31.2	2.9	1.5	1201172
<i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng. (Lamiaceae)	Oregano	II	AP	>1000	31.2	6.7	5.4	1204423
<i>Moussonia deppeana</i> (Schldl. & Cham.) Klotzsch ex Hamst. (Gesneriaceae)	Transichinole	U, DI, SA	L/S	>1000	15.6	1.0	1.4	1201171
<i>Gustarium coultteri</i> A. Gray (Zygophyllaceae)	Cuachalalate blanco, Guayacán	C, U, DD	B	>1000	<15.6	2.1	1.9	2042
<i>Persea americana</i> Mill. (Lauraceae)	Aguacate	DD, DI, PA, SA	L	>1000	<7.5	5.7	5.5	1201175
<i>Tecoma stans</i> (L.) Juss. ex Kunth (Bignoniaceae)	Tronadora	C, SP, DI	AP	1000	500	7.0	2.9	1211818
<i>Teloxys ambrasioides</i> (L.) W.A. Weber (Chenopodiaceae)	Epazote verde	SA, DI, PA	AP	1000	250	1.7	1.6	1201176
<i>Plantago major</i> L. (Plantaginaceae)	Llantén	DI	AP	1000	250	2.9	1.8	1211826
<i>Colandrinia murumika</i> Schldl. (Portulacaceae)	Chivilos	DD	L/S	1000	250	0.1	1.6	1222019
<i>Machaeranthera tonacetifolia</i> (Kunth) Nees (Asteraceae)	Árnica Morada de Chihuahua	U	AP	1000	125	2.4	5.8	1222012
<i>Tillandsia usneoides</i> (L.) L. (Bromeliaceae)	Heno	C, DD	AP	1000	125	2.2	2.3	1214144
<i>Hesperis matronalis</i> Epling (Lamiaceae)	Orégano (NIJM)	II, SA	AP	1000	62.5	7.4	8.8	1501
<i>Ruta chalepensis</i> L. (Rutaceae)	Ruda	SA, DD, PA	AP	1000	62.5	2.1	2.9	1201180
<i>Campylopusium amphistemon</i> (Kunze ex Klotzsch) Fée (Polypodiaceae)	Lengua de ciervo	PA	L	1000	<62.5	2.2	0.7	1230313
<i>Machaeranthera riparia</i> (Kunth) A.G. Jones (Asteraceae)	Árnica Morada de lavar, Chihuahua	DD	AP	1000	62.5	5.7	7.7	1222013
<i>Eryngium carolinense</i> F. Delaroché (Apiaceae)	Hierba del sapo	DD	AP	1000	31.2	1.0	0.3	1211838
<i>Lippia berlandieri</i> Schauer (Verbenaceae)	Orégano	II, DD, SA	AP	1000	31.2	1.8	0.8	1507
<i>Verbena carolinensis</i> L. (Verbenaceae)	Verbena	U, SA, PA	AP	1000-500	62.5-125	3.1	2.9	1201174
<i>Olea europaea</i> L. (Oleaceae)	Olivo	DD, SA	L/S	500	>500	5.0	6.4	1211834
<i>Tagetes lucida</i> Cav. (Asteraceae)	Pericón	SA, DI, DD	L/S	500	500	4.0	5.3	1201173
<i>Amphipterygium adstringens</i> (Schldl.) Standl. (Anacardiaceae)	Cuachalalate (GC)	G, U, SC	B	500	250	1.8	5.8	1490/1491
<i>Priva grandiflora</i> (Ortega) Moldenke (Verbenaceae)	Hierba de San Juan	DI	AP	500	250	1.6	1.5	1214141
<i>Eupatorium petiolare</i> Moc. ex DC. (Asteraceae)	Hierba del Ángel	DI, DD	AP	500	125	4.7	1.3	1211817
<i>Monarda austrorontensis</i> Epling (Lamiaceae)	Orégano de Chihuahua	DD	AP	500	125	5.0	4.3	2041
<i>Gnaphalium canescens</i> DC. (Asteraceae)	Cordobolob	C, SA, DI	AP	500	62.5	8.6	1.8	1211825
<i>Larrea tridentata</i> (Sessé & Moc. ex DC.) Coville (Zygophyllaceae)	Gobernadora	DD	AP	500	62.5	4.9	6.1	1493
<i>Tahonia diversifolia</i> (Hemsl.) A.G. (Asteraceae)	Árnica	SA, DD	AP	500	62.5	5.5	6.1	1201170
<i>Grindelia inuloides</i> Willd. (Asteraceae)	Árnica de Tepeaca	DI	AP	500	62.5	3.7	3.9	1222015
<i>Buddleja perfoliata</i> Kunth (Loganiaceae)	Salvia de Bolita	DD	AP	500	<62.5	4.2	1.7	1211839
<i>Heterotheca inuloides</i> Cass. (Asteraceae)	Árnica del país	U, G, DI	AP	500	31.25	1.5	2.0	1211822
<i>Mirabilis jalapa</i> L. (Nyctaginaceae)	Maravilla	DI, SP	AP	250	>500	1.3	0.4	1211819
<i>Cytisarcya praeoria</i> Kunth (Anacardiaceae)	Chupandilla	DI	B	250	≥500	11.2	17.0	2043
<i>Teloxys graveolens</i> (Willd.) W.A. Weber (Chenopodiaceae)	Epazote de zorriño	SA, DD, PA, DI	AP	250	62.5	1.7	0.8	1211814
<i>Annona cherimola</i> Mill. (Annonaceae)	Chirimoya	DI, PA, U	L/S	250	<15.6	1.9	0.5	1211832

<i>Mentha × piperita</i> L. (Lamiaceae)	Hierbabuena (FCH)	SA, DO, G, DI	U/S	<250	500	2.1	4.4	1211815
<i>Cuphea aequipetala</i> Cav. (Lythraceae)	Hierba del cáncer	DI, SA	AP	125	>500	2.3	0.7	1211831
<i>Ludwigia repens</i> J. R. Forst. (Onagraceae)	Silveria	G	AP	125	500	4.5	7.0	1222022
<i>Artemisia ludoviciana</i> Nutt. subsp. <i>mexicana</i> (Willd. ex Spreng.) Fernald (Asteraceae)	Estafiate	SA, DI, PA	U/S	125	250	2.3	1.8	1211833
Amoxicillin				0.05	0.1			
Metronidazole				75	300			

<sup>a</sup> Botanical species were mainly obtained from "Sonora" Market (México, D.F.) or collected in the field. When specified, plants were obtained from: NLMM: "Mesón de Estrella" Market, Monterrey, Nuevo León; NLJM: "Juárez" Market, Monterrey, Nuevo León; RCM: "Real de Catorce" Market; GC: gathering center (Asochilpan, Morelos/Jalisco, Puebla); FCH: Hydroponic Culture, Facultad de Ciencias, UNAM.

<sup>b</sup> Folk usage: G: gastritis; U: stomach and/or duodenal ulcer; SA: stomach ache; DI: diarrhea; PA: parasites; DD: digestive disorders; II: intestinal infections; SC: stomach cancer; SP: stomach problem.

<sup>c</sup> AP: aerial part; U/S: leaf/stem; B: bark; L: leaf; R/B: root/bark; F: flower; L/B: leaf/branch.

## 2.2. Extract preparation

Fifty grams of each sample was used to prepare the extracts. For aqueous extracts (AEs), the plant was boiled for 10 min with 600 ml of tap water, filtered and centrifuged for 10 min at 3000 rpm; afterwards the supernatant was lyophilized. In the case of methanol extracts (MEs), the material was extracted for 72 h with 200 ml of methanol. After filtration, the extracts were evaporated under reduced pressure, below 50 °C.

## 2.3. Bacterial strain and culture conditions

*Helicobacter pylori* standard strain ATCC 43504 was grown on Casman agar base (BBL) plates supplemented with 5% defibrinated sheep blood, and 10 µg/ml vancomycin for a day at 37 °C under microaerophilic conditions (10% CO<sub>2</sub>). The strains were identified by Gram staining morphology and biochemical testing.

## 2.4. Minimum inhibitory concentration (MIC) determinations

The AEs were tested with the agar dilution method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recommendations, in Mueller–Hinton agar (DIFCO) plates with 5% defibrinated sheep blood, vancomycin (10 mg/l), trimethoprim (5 mg/l), amphotericin B (2 mg/l), and polymyxin B (2.5 mg/l), and containing the plant extract to be tested. The AEs were dissolved in a minimal volume of sterile distilled water to obtain a final concentration in the plate of 125, 250, 500, and 1000 µg/ml. A volume of 0.1 ml *Helicobacter pylori* (~10<sup>7</sup> CFU) was spread onto the plates and incubated for 5 days as previously described. Growth control plates were included in each experiment. The MIC was determined from visual examinations as being the lowest concentration of the extracts in the plate with no bacterial growth.

For the MEs, MIC was determined in broth cultures containing Mueller–Hinton broth (DIFCO), 0.2% β-cyclodextrin and 10 µg/ml vancomycin, incubated under gentle shaking (150 rpm) for the time of the experiment in the above described conditions. The extracts were dissolved in DMSO to give final concentrations in the culture of 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250, and 500 µg/ml. These dilutions (in a volume of 20 µl DMSO) were added to 3 ml of *Helicobacter pylori* broth culture at the beginning of the exponential growth phase (~10<sup>8</sup> CFU/ml). ΔA<sub>660</sub> was determined after 18 h of incubation and was used to calculate the percentage of growth inhibition with respect to a control that grew only with DMSO (which does not have any effect on bacterial growth at the used concentration).

All the experiments were performed in triplicate. Amoxicillin and metronidazole were used as reference antibiotics for validation of results.

## 3. Results

Methanolic and aqueous extracts of 53 different plant species (49 genera in 29 families) used in Mexican traditional medicine to treat gastrointestinal disorders were screened *in vitro* for their anti-*Helicobacter pylori* activity. The results are shown in Table 1, and the species are organized in the order of aqueous extract effectiveness. The resulting activities were classified as follows: for AEs, MIC values in µg/ml >1000, null; 1000, low; 500, moderate; 250, good; and <250 to <125, strong; for MEs, MIC values in µg/ml >500, null; 500–250, low; 125–62.5, moderate; <62.5 to 31.25, good; and 15.6 to <7.8, strong.

AEs of *Mentha × piperita*, *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana*, *Cuphea aequipetala*, and *Ludwigia repens* showed the highest inhibitory effect; in contrast, MEs of these plants had little action against *Helicobacter pylori*. Among the MEs, the most active plants were *Persea americana*, *Annona cherimola*, *Guaiacum coulteri*, and *Moussonia deppeana*, with MIC values of <7.5, <15.6, ≤15.6, and



15.6 µg/ml, respectively. It is interesting to note that only the AE of *Annona cherimola* also had good activity against the bacteria.

Compared with the reference antibiotic amoxicillin, the most active extracts inhibit the growth of *Helicobacter pylori* at much higher concentrations; but compared with metronidazole, the MEs with MIC values of 250 µg/ml or less were better than metronidazole. It is worth noting that we tested extracts and not isolated compounds; hence the isolation of different and potent compounds from the most active extracts is encouraging.

#### 4. Discussion and conclusions

Before the recognition of *Helicobacter pylori* as the main etiological agent of chronic gastritis and peptic ulcer disease, the research studies to elucidate the mechanisms by which traditional medicinal plants exert their actions were focused on their gastroprotective, and/or anti-acid, and/or anti-inflammatory effects (Borrelli and Izzo, 2000). In recent years a great deal of research has been undertaken to determine a direct action of plants upon *Helicobacter pylori*. Although CLSI has made important recommendations to standardize the antimicrobial susceptibility testing procedures, and some plant screenings have begun to apply them, *in vitro* studies still lack a normalization that would allow for the meaningful comparisons of activity. However, because these guidelines are proposed for testing pure compounds, their strict utilization must be adjusted in the case of crude plant extracts, mainly in the case of apolar ones, where its solubility is restricted in the agar dilution method recommended by the CLSI. Therefore it is necessary to develop a reliable standardized method to test *in vitro* the anti-*Helicobacter pylori* activity of plant extracts. The broth dilution method used here allows the rapid partition of most of the methanolic extract tested, making this methodology a good candidate for routine screening work for apolar extracts.

The present study represents the first directed work to test exclusively the *in vitro* activity against *Helicobacter pylori* of a large number of Mexican traditional plants used for gastrointestinal illness. Also it reports for the first time the strong anti-*Helicobacter pylori* activity of the AEs from *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana*, *Ludwigia repens*, and *Cuphea aequipetala*, and the MEs from *Persea americana*, *Guaicum coulteri*, *Moussonia deppeana*, and *Annona cherimola*. It would be promising to use them alone or in combined therapies in *in vivo* studies to confirm their bioactivity.

The anti-*Helicobacter pylori* activity of *Amphipterygium adstringens* bark and its components have been published recently (Castillo-Juarez et al., 2007). Other species used in this work, have previously been proved against the bacteria. The 95% ethanol extract of *Chenopodium ambrosioides* (the basionym of *Teloxys ambrosioides*) resulted to have a moderate activity against the bacteria (Wang and Huang, 2005). It has also been reported that the ME and AE of *Mentha × piperita* had weak activity against *Helicobacter pylori* (Mahady et al., 2005; Nostro et al., 2005); nevertheless, we found that our AE had strong anti-*Helicobacter pylori* activity. Also, the 70% aqueous methanol extract of *Ocimum basilicum* has been reported as inactive against *Helicobacter pylori* 43504 (Stamatis et al., 2003); but our ME at 100% had good activity against the bacteria. As we stated before, it is difficult to compare results. These discrepancies may be due to the method of bioassay employed as well as other variables such as the bacterial number or the solvent used to make the extraction.

The methodology used in this work was standardized in order to test the activity of many different plants, so we cannot exclude the possibility that in some cases the active components were not extracted, for example the most volatile ones that would evaporate when plants are boiled.

Many of the most active anti-*Helicobacter pylori* plants have a long history of traditional use as water-based remedies for gastrointestinal afflictions (Argueta et al., 1994). We found four MEs exhibited strong antibacterial activity against *Helicobacter pylori* even though records of their traditional preparation do not include alcohol-based preparations; hence their observed activity *in vitro* suggests new areas of field and laboratory research as well as novel applications in community based health programs.

In general, the results indicated that 77% of the assayed plants are active in at least one of the tested extracts, having from moderate to strong antibacterial activity against *Helicobacter pylori*. Taking into account that many of the active medicinal plants are also used as condiments or food ingredients (e.g., *Ocimum basilicum*, *Persea americana*, *Lippia berlandieri*, *Teloxys graveolens*), their frequent consumption could have a preventive effect in controlling the *Helicobacter pylori* population of infected people, rather than an eradicating action.

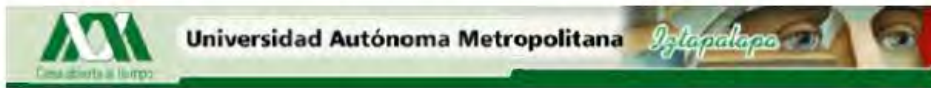
Our results provide valuable information about plants with high anti-*Helicobacter pylori* activity, which will become the starting material for bioassay guided fractionation to determine the active constituents of the plant extracts. These data also contribute to the understanding of the mode of action of these medicinal plants and to the development of new anti-*Helicobacter pylori* therapies.

#### Acknowledgements

Partially supported by DGAPA-UNAM (IN-218108). We thank Carlos Iglesias, Jardín Botánico Francisco Xavier Clavijero, Jalapa for his collaboration in the collection of *Tithonia diversifolia*, and Paul Hersh, Jardín Etnobotánico del INAH Morelos, for his support in the collection of *Cyrtocarpa procera*.

#### References

- Ankli, A., Heinrich, M., Bork, P., Wolfram, L., Bauerfeind, P., Brun, R., Schmid, C., Weiss, C., Bruggisser, R., Gertsch, J., Wasescha, M., Sticher, O., 2002. Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. *Journal of Ethnopharmacology* 79, 43–52.
- Argueta, A., Cano, L.M., Rodarte, M.E. (Coord.), 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, vols. I–III. Instituto Nacional Indigenista, México.
- Atherton, J.C., 2006. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastrointestinal diseases. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 1, 63–96.
- Borrelli, F., Izzo, A.A., 2000. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytotherapy Research* 14, 581–591.
- Bye, R., Linares, E., Estrada, E., 1995. Biological diversity of medicinal plants in Mexico. In: Amason, J.T., Mata, R., Romeo, J.T. (Eds.), *Phytochemistry of Medicinal Plants (Recent Advances in Phytochemistry)*, vol. 29. Plenum Press, New York, pp. 65–82.
- Castillo-Juarez, I., Rivero-Cruz, F., Celis, H., Romero, I., 2007. Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology* 114, 72–77.
- Mahady, G.B., Pendland, S.L., Stoa, A., Hamill, F.A., Fabricant, D., Dietz, B.M., Chadwick, L.R., 2005. *In vitro* susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytotherapy Research* 19, 988–991.
- Nostro, A., Cellini, L., Di Bartolomeo, S., Di Campi, E., Grande, R., Cannatelli, M.A., Marzio, L., Alonzo, V., 2005. Antibacterial effect of plant extracts against *Helicobacter pylori*. *Phytotherapy Research* 19, 198–202.
- Perez-Perez, G.J., Rothenbacher, D., Brenner, H., 2004. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 9 (Suppl. 1), 1–6.
- Stamatis, G., Kyriazopoulos, P., Golegou, S., Basayiannis, A., Skaltsas, S., Skaltsa, H., 2003. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of Greek herbal medicines. *Journal of Ethnopharmacology* 88, 175–179.
- Villasenor, J.L., 2004. Los géneros de las plantas vasculares de la flora de México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 75, 105–135.
- Wang, Y.C., Huang, T.L., 2005. Screening of anti-*Helicobacter pylori* herbs deriving from Taiwanese folk medicinal plants. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 43, 295–300.
- Wolle, K., Malfertheiner, P., 2007. Treatment of *Helicobacter pylori*. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 21, 315–324.



## DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



*“Actividad anti-*Helicobacter pylori* de extractos de plantas medicinales mexicanas utilizadas para trastornos digestivos”.*

# TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

LIC. EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL.

PRESENTA:

**Héctor Ricardo Jaime Aguilar**

DIRECTORES DE TESIS:

**DRA. IRMA ROMERO ÁLVAREZ**

**BIOL. ISRAEL CASTILLO JUÁREZ**

**M. EN C. ARTURO LEOPOLDO PRECIADO LÓPEZ**



2007

I



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

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

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

BEATRIZ REYES GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. IRMA ROMERO ÁLVAREZ  
BIÓLOGO ISRAEL CASTILLO JUÁREZ



2008

COMUNIDAD

Edición especial de  
*Neurochemical Research*  
en honor de Ricardo Tapia

▷ 6

GOBIERNO

Crean beca de doctorado  
**Gonzalo Río Arronte**

Financiará estudios de mexicanos en Ciencias Biológicas,  
en la Watson School of Biological Sciences, de Nueva York

▷ 18

Ciudad Universitaria  
8 de diciembre de 2008  
Número 4,123  
ISSN 0188-5138



# Gaceta

ÓRGANO INFORMATIVO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



▷ Detienen el crecimiento y matan al microorganismo

## Descubren compuestos contra bacteria causante de la gastritis

▷ La corteza del cuachalalate contiene alquilfenoles que combaten a *Helicobacter pylori* ▷ El padecimiento puede degenerar en úlcera péptica o duodenal

▷ 10

### DISTINCIÓN AL MEMORIAL DEL 68



El INAH otorgó a la exposición universitaria el Premio Miguel Covarrubias de este año, por mejor trabajo de planeación y proyecto de museo abierto al público. Foto: Barry Domínguez

▷ 14

### COMUNIDAD

Concuraron 26 universidades  
**Premio Nacional  
del Acero para  
dos alumnas de  
Arquitectura**

▷ 4

### GOBIERNO

Tema para  
el Centro de  
Investigación  
en Energía

▷ 19

Gaceta en línea: [www.gaceta.unam.mx](http://www.gaceta.unam.mx)

LAURA ROMERO

La corteza del cuachalalate (*Amphipteringium adstringens*) no sólo contiene compuestos antiulcerosos y antiinflamatorios, como ya se había demostrado, sino también otros que actúan contra el microorganismo *Helicobacter pylori*, principal causante de la gastritis crónica.

Un equipo multidisciplinario de científicos universitarios, encabezado por Irma Romero Álvarez, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, descubrió que esa planta, tradicional de la herbolaria mexicana, contiene sustancias con efecto bacteriostático (detiene el crecimiento de la bacteria) y bactericida (la mata); se piensa aislar dichos compuestos para probar su posible función como antibióticos alternativos en el tratamiento de ese padecimiento.

Ese microorganismo es uno de los principales causantes de la gastritis crónica, que puede degenerar en úlcera gástrica o duodenal y, en menor porcentaje, en cáncer gástrico. También se asocia con el linfoma MALT (Tejido Linfocito Asociado a Mucosas).

Las terapias existentes fallan en 20 por ciento de los casos, principalmente porque las bacterias generan resistencia a los fármacos; de ahí, aseguró, la importancia de encontrar nuevos elementos que ayuden a los pacientes a superar el mal, dijo Romero Álvarez.

La incidencia de la gastritis en México se desconoce, aunque se encuentra entre las 10 primeras causas de atención en el sector salud; además, se calcula que la prevalencia de personas con *H. pylori* es de alrededor de 60 por ciento, resaltó.

Eso no significa que esas personas desarrollarán el padecimiento, presentarán los síntomas de la gastritis—acidez estomacal y ardor—o de la úlcera—sangrado que de no tratarse puede causar la muerte—; algunas vivirán con la bacteria sin problemas, aclaró.

En países y regiones industrializadas, como Estados Unidos o Europa, el porcentaje de población con ese bacilo es menor, pues la incidencia depende de factores socioeconómicos que tienen que ver directamente con las condiciones sanitarias de la población.

La académica recordó que antes de 1983 se pensaba que la gastritis era producida por algún efecto físico, como el uso de medicamentos, café, alimentos irritantes o estrés; entonces, el tratamiento consistía en la ingesta de antiácidos. Ese año, agregó, se descubrió la presencia de *H. pylori* y ahora se sabe que el tratamiento debe incluir antibióticos.

No obstante, alertó que de no haber una sintomatología definida, no es recomendable destruir a la bacteria. Parece ser que su presencia protege del desarrollo de algunas enfermedades del tracto digestivo superior; entonces, sólo cuando haya síntomas graves de gastritis crónica activa o úlceras, entre otros, debe eliminarse.



Es una planta tradicional de la herbolaria mexicana. Foto: Fernando Velázquez.

## Descubren universitarios compuestos contra bacteria causante de gastritis

Los obtienen de la corteza del cuachalalate; actúan contra *Helicobacter pylori*

### La herbolaria, tradición mexicana

En México, el uso de plantas medicinales proviene de la época prehispánica y permanece vigente; la población utiliza algunas para curarse de la gastritis.

Por ello, desde su tesis de licenciatura Israel Castillo, hoy estudiante doctoral, se ha dedicado a investigar si ese conocimiento tradicional realmente tiene un efecto sobre *H. pylori*.

En la nación se ha reportado unas tres mil plantas de uso médico y, de ellas, unas cien son destinadas a la gastritis, úlcera y trastornos del estómago. Hasta el momento, el equipo universitario ha analizado la acción de extractos acuosos y metabólicos de al menos 55 de ellas, como epazote, árnica, silveria, hierba del cáncer y cancerina, contra *H. pylori*; en 77 por ciento de ellas se ha detectado alguna actividad bactericida que va desde moderada a fuerte.

En el caso del cuachalalate se ha obtenido e identificado compuestos como terpenos, esteroides y alquilfenoles; los últimos son los responsables de la actividad antibacteriana de la planta.

“Se hicieron mediciones de las concentraciones que logran ese efecto; se determinó que con 16 microgramos por mililitro de los también llamados ácidos anacárdicos, se inhabilita en cien por ciento el crecimiento del bacilo, y con una concentración mayor muere en dos horas.”

Las células de las bacterias expuestas a esos ácidos—según los resultados publicados en el *Journal of Ethnopharmacology*—presentaron un efecto directo: su citoplasma y membranas se dañaron. Así, con ayuda de la técnica de microarreglos—que permite identificar qué genes del microorganismo se expresan al entrar en contacto con algún compuesto—, pretende determinarse la de estos acción sobre el bacilo.

También se ha medido su toxicidad en linfocitos humanos y los compuestos han resultado inocuos. Los efectos son prometedores y podrían llegar a ser antibióticos funcionales, aseguró la doctora en investigación biomédica básica (bioquímica) por la UNAM e integrante del Sistema Nacional de Investigadores.

Asimismo, se planea iniciar, en este semestre, los experimentos *in vivo*, con modelos animales. El plan consiste en infectar a roedores—gerbos—con la bacteria para determinar si los extractos de la planta y/o los compuestos aislados previenen la colonización y desarrollo de los síntomas propios de la enfermedad, tales como gastritis, úlcera e, incluso, cáncer.

Para alcanzar los objetivos se cuenta con la participación de expertos de los institutos de Biología y Fisiología Celular, así como de la Facultad de Química y del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. *JR*



## Boletín UNAM-DGCS-768 Ciudad Universitaria

### DESCUBREN UNIVERSITARIOS, COMPUESTOS CONTRA BACTERIA CAUSANTE DE GASTRITIS

- *La corteza del cuachalalate contiene alquilfenoles con actividad bactericida contra Helicobacter pylori, dijo Irma Romero, del Departamento de Bioquímica de la FM de la UNAM*
- *Detienen el crecimiento y matan al microorganismo; se planea extraer antibióticos, como alternativa para el tratamiento de la enfermedad*
- *Ese padecimiento puede degenerar en úlcera péptica o duodenal y, en menor porcentaje, en cáncer gástrico*

La corteza del cuachalalate (*Amphytergium adstringens*) no sólo contiene compuestos antiulcerosos y antiinflamatorios, como ya se había demostrado, sino también otros que actúan contra el microorganismo *Helicobacter pylori*, principal causante de la gastritis crónica.

Un equipo multidisciplinario de científicos universitarios, encabezado por Irma Romero Álvarez, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina (FM), descubrieron que esa planta, tradicional de la herbolaria mexicana, contiene sustancias con efecto bacteriostático (detiene el crecimiento de la bacteria) y bactericida (la mata); se piensa aislar dichos compuestos para probar su posible función como antibióticos, alternativos en el tratamiento de ese padecimiento.

Ese microorganismo es uno de los principales causantes de la gastritis crónica, que puede degenerar en úlcera gástrica o duodenal y, en menor porcentaje, en cáncer gástrico. También, se asocia con el linfoma MALT (Tejido Linfoide Asociado a Mucosas).

Las terapias existentes fallan en un 20 por ciento de los casos, principalmente porque las bacterias generan resistencia a los fármacos y, de ahí, la importancia de encontrar nuevos elementos que ayuden a los pacientes a superar el mal, dijo Romero Álvarez.

La incidencia de la gastritis en México se desconoce, pero se encuentra entre las 10 primeras causas de atención en el sector salud; además, se calcula que la prevalencia de personas con *Helicobacter* es de alrededor del 60 por ciento.

Eso no significa que esas personas desarrollarán el padecimiento, ni presentarán los síntomas de la gastritis –acidez estomacal y ardor–, o de la úlcera –sangrado, que de no tratarse puede provocar la muerte–; algunas vivirán con la bacteria sin problemas, aclaró.

En países y regiones industrializadas, como EU o Europa, el porcentaje de población con ese bacilo es menor, pues la incidencia depende de factores socioeconómicos que tienen que ver directamente con las condiciones sanitarias de la población.

La académica recordó que antes de 1983 se pensaba que la gastritis era producida por algún efecto físico, como el uso de medicamentos, café, alimentos irritantes, o estrés; entonces, el tratamiento consistía en la ingesta de antiácidos. Pero ese año se descubrió la presencia de *Helicobacter*, y ahora se sabe que el tratamiento debe incluir antibióticos.

No obstante, alertó que de no haber una sintomatología definida, no es recomendable destruir a la bacteria. “Parece ser que la presencia de *Helicobacter* protege del desarrollo de algunas enfermedades del tracto digestivo superior; entonces, sólo cuando haya síntomas graves de gastritis crónica activa o úlceras, entre otros, debe eliminarse”.

*La herbolaria, tradición mexicana*

En México, el uso de plantas medicinales proviene de la época prehispánica y permanece vigente; la población utiliza algunas para curarse de la gastritis.

Por ello, desde su tesis de licenciatura Israel Castillo, hoy estudiante doctoral, se ha dedicado a investigar "si ese conocimiento tradicional realmente tiene un efecto sobre *Helicobacter*".

En la nación, se han reportado alrededor de tres mil plantas de uso médico y, de ellas, unas 100 son destinadas para la gastritis, úlcera y trastornos del estómago. Hasta el momento, el equipo universitario ha analizado la acción de extractos acuosos y metabólicos de al menos 55, como epazote, árnica, silveria, hierba del cáncer y cancerina, contra *Helicobacter*; en 77 por ciento de ellas se ha detectado alguna actividad bactericida que va desde moderada a fuerte.

En el caso del cuachalalate, se han obtenido e identificado compuestos como terpenos, esteroides y alquifrenos; los últimos son los responsables de la actividad antibacteriana de la planta.

"Se hicieron mediciones de las concentraciones que logran ese efecto; se determinó que con 16 microgramos por mililitro de los también llamados ácidos anarcárdicos, se inhabilita en un 100 por ciento el crecimiento del bacilo, y con una concentración mayor, muere en dos horas".

Las células de las bacterias expuestas a esos ácidos –según los resultados publicados en el *Journal of Ethnopharmacology*–, presentaron un efecto directo: su citoplasma y membranas se dañaron. Así, con ayuda de la técnica de microarreglos –que permite identificar qué genes del microorganismo se expresan al entrar en contacto con algún compuesto–, se pretende determinar su acción sobre el bacilo.

También se ha medido su toxicidad en linfocitos humanos y los compuestos han resultado inocuos. "Los efectos son prometedores y podrían llegar a ser antibióticos funcionales", aseguró la doctora en investigación biomédica básica (bioquímica) por la UNAM, e integrante del Sistema Nacional de Investigadores.

Asimismo, se planean iniciar, en este semestre, los experimentos *in vivo*, con modelos animales. El plan consiste en infectar a roedores –gerbos–, con la bacteria para determinar si los extractos de la planta y/o los compuestos aislados previenen la colonización y desarrollo de los síntomas propios de la enfermedad (gastritis, úlcera e, incluso, cáncer)

Para alcanzar los objetivos, se cuenta con la participación de expertos de los institutos de Biología y Fisiología Celular, así como de la Facultad de Química y del Centro de Investigación y Estudios Avanzados, del Instituto Politécnico Nacional.

--o0o--



En México, existen aproximadamente tres mil plantas medicinales; de ellas, unas 100 son destinadas a la gastritis, úlcera y trastornos del estómago, dijo Irma Romero, de la FM de la UNAM.



Cuando la bacteria *Helicobacter pylori*, causante de la gastritis, es expuesta a los ácidos anarcárdicos del cuachalalate, el citoplasma y membrana de sus células se dañan, explicó Irma Romero.

# La Jornada

lunes 8 de diciembre de 2008

## Científicos de la UNAM descubren nuevo tratamiento contra la gastritis

■ La corteza del cuachalalate actúa contra la *Helicobacter pylori*

Un equipo multidisciplinario de científicos universitarios descubrió que la corteza del cuachalalate, planta tradicional de la herbolaria mexicana, contiene compuestos que actúan contra el microorganismo *Helicobacter pylori*, principal causante de la gastritis crónica, por lo que trabajan en aislar sus elementos para probar su posible función como antibiótico en el tratamiento de este padecimiento, que puede degenerar en úlcera gástrica o duodenal y, en menor porcentaje, en cáncer gástrico.

También, se asocia con el linfoma MALT (tejido linfóide asociado a mucosas).

La Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) informó que la sustancia descubierta tiene efecto bacteriostático (detiene el crecimiento de la bacteria) y bactericida (la mata); del cuachalalate ya se había demostrado que contiene compuestos antiulcerosos y antiinflamatorios.

El equipo multidisciplinario lo encabeza Irma Romero Álvarez, del departamento de bioquímica de la Facultad de Medicina, quien sostuvo que las terapias existentes para tratar la gastritis fallan en 20 por ciento de los casos, principalmente porque las bacterias generan resistencia a los fármacos, y de ahí la importancia de encontrar nuevos elementos que ayuden a los pacientes a superar el mal.

La incidencia de la gastritis en México se desconoce, pero se encuentra entre las 10 primeras causas de atención en el sector salud; además se calcula que la prevalencia de personas con *Helicobacter* es de alrededor de 60 por ciento.

Eso no significa que esas personas desarrollarán el padecimiento ni presentarán los síntomas de la gastritis—acidez estomacal y ardor— o de la úlcera; algunas vivirán con la bacteria sin problemas, aclaró.

En países y regiones industrializadas, como Estados Unidos o Europa, el porcentaje de población con ese bacilo es menor, pues la incidencia depende de factores socioeconómicos que tienen que ver directamente con las condiciones sanitarias de la población.

La académica recordó que antes de 1983 se pensaba que la gastritis era producida por algún elemento físico, como café, alimentos irritantes o estrés; entonces, el tratamiento consistía en antiácidos. Pero ese año se descubrió la presencia de *Helicobacter*, y ahora se sabe que el tratamiento debe incluir antibióticos.

# MILENIO

2008-12-09•Tendencias

La UNAM identifica componentes bactericidas en la corteza.

## Árbol de cuachalalate protege de la gastritis

Antecedente de la úlcera, la afección nace del microbio *Helicobacter pylori*. Científicos estudian las propiedades de más de 55 plantas tradicionales.

Científicos de la UNAM demostraron que la corteza de un árbol usada en la herbolaria tradicional mexicana posee compuestos químicos capaces de frenar o eliminar al microbio que causa la gastritis crónica. La esperanza es aislar dichos compuestos y probar su efectividad como antibióticos alternos.

Un equipo encabezado por Irma Romero Álvarez, de la Facultad de Medicina de la UNAM, ha estudiado las plantas de la farmacopea tradicional en busca de compuestos activos contra enfermedades comunes.

En particular, la gastritis es una afección de interés para los científicos porque hoy se sabe que el agente causal más importante es la bacteria *Helicobacter pylori* (antes se creía que la causa era una combinación de factores que incluía el estrés). Si se logra neutralizar al microbio, se pueden prevenir los impactos de largo plazo de la gastritis: úlceras gástricas o duodenales y algunos casos de cáncer gástrico.

Curiosamente, los expertos de la UNAM recurrieron a la medicina alternativa (para buscar una terapia alternativa! Y es que los tratamientos convencionales contra *H. pylori* fallan en uno de cada cinco casos, a menudo porque el microbio desarrolla resistencia a las medicinas, dijo Romero Álvarez.

Parte del problema reside en que en muchas ocasiones la gastritis no produce síntomas, y los impactos sobre la salud se detectan cuando ya tiene mucho tiempo lastimando el revestimiento del sistema digestivo. Y aunque no se tiene certeza de cuán común es la gastritis en México, estudios de salud pública sugieren que en la población adulta, de 60 a 70 por ciento ya alojan a la bacteria en su intestino.

La experta, miembro del Sistema Nacional de Investigadores, aclaró que traer la bacteria en el interior no es sinónimo de enfermedad. Una gran mayoría de esas personas convivirán sin problemas con la bacteria. Sólo en algunos casos se presenta gastritis, en forma de acidez estomacal y ardor persistentes, y en otras ocasiones úlceras, sangrados internos que deben tratarse de inmediato.

En concreto, si *H. pylori* no causa problemas en forma de gastritis o úlcera, los expertos recomiendan esperar. "Parece ser que la presencia de *Helicobacter* protege del desarrollo de algunas enfermedades del tracto digestivo superior", dijo la



experta de la UNAM. “Entonces, sólo cuando haya síntomas graves de gastritis crónica activa o úlceras, entre otros, debe eliminarse”.

En la Facultad de Medicina los especialistas han emprendido la búsqueda de compuestos activos recurriendo a la medicina tradicional. Según Israel Castillo, miembro del equipo de trabajo, de las tres mil plantas reportadas con usos médicos, cerca de un centenar tienen como diana las gastritis, úlceras y trastornos estomacales.

A la fecha, los académicos han sondeado las posibilidades terapéuticas contra *Helicobacter pylori* de al menos 55 plantas, que incluyen desde epazote y árnica hasta silveria, hierba del cáncer y cancerina. El potencial es claro: 77 por ciento de ellas tienen capacidad bactericida entre moderada y fuerte.

Entre las plantas analizadas está el cuachalalate, conocido por los científicos como *Amphypteringium adstringens*, y por los antiguos mexicanos como “árbol de la chachalaca”.

Sus propiedades médicas están registradas desde hace siglos, pues ya en 1573 un expedicionario español, Francisco Hernández, registró que la corteza de cuachalalate tiene capacidades antitumorales y propiedades frías y secantes.

La corteza de este árbol ha sido usada por siglos en la herbolaria tradicional para limpiar la sangre y combatir vrices, para apagar los fuegos y úlceras en la boca y hasta para atenuar el insufrible dolor de muelas. De hecho, los yerberos recomiendan una infusión de cuachalalate con árnica para la gastritis y la úlcera gástrica.

Los científicos habían demostrado ya que los compuestos hallados en esta corteza actúan contra las úlceras y

las inflamaciones, pero ahora encontraron compuestos con capacidades bacteriostáticas y bactericidas.

En específico, se identificaron en la corteza compuestos como terpenos, esteroides y alquifílenos o ácidos anacárdicos; son estos últimos a los que se detectó actividad antibacterial.

Los resultados son elocuentes: con 16 microgramos por mililitro se frena por completo el crecimiento de *Helicobacter pylori*. Si se aumenta la dosis, el microbio muere en un plazo de dos horas.

Los compuestos bactericidas, por otro lado, no dañan a los linfocitos humanos, algo importante si se pretender llegar a convertirlos en antibióticos, dijo Romero Álvarez.

Con la ayuda de colegas de los institutos de Biología y Fisiología Celular, de la Facultad de Química y del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, los especialistas están listos para seguir dos líneas de investigación.

En la primera, usarán microarreglos para determinar con mayor precisión el impacto de cada compuesto sobre el microbio: ¿qué genes se activan o qué proteínas se producen cuando *Helicobacter* entra en contacto con un alquifíleno? Tal es la pregunta que deben responder.

Por otro lado, pronto empezarán a realizarse pruebas in vivo con animales. El equipo de la UNAM tratará de determinar si los compuestos aislados de la corteza de cuachalalate pueden impedir que la bacteria colonice el interior del sistema gástrico de jerbos o por lo menos si pueden prevenir el desarrollo de patologías.

### Cuatro actores, un drama

La ciencia ataca a la herbolaria y va más allá: los yerberos han usado por siglos la corteza del árbol cuachalalate contra las gastritis. Expertos de la UNAM han logrado aislar los compuestos capaces de matar a la bacteria que produce la enfermedad.

#### El villano



- **Helicobacter pylori**  
Es una bacteria que coloniza la parte interna del estómago y produce una inflamación de la membrana.
- **¿Y los síntomas?**  
El problema es que cuatro de cada cinco afectados por la bacteria no presentan ningún síntoma.

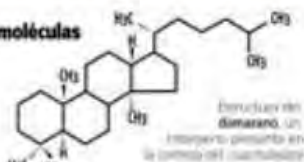
#### La experta



- **Irma Romero Álvarez**  
El equipo que dirige ha evaluado el potencial de al menos 55 plantas tradicionales contra la bacteria de la gastritis.

PIRELLA GUTIERREZ

#### Las moléculas



#### Ácidos anacárdicos

- **Ácidos anacárdicos**  
La mezcla con capacidad antibacterial contiene tres terpenos conocidos: ácido masocadenónico, ácido 3-vinilo hidroximasocadenónico y ácido 3-epi-cleandrico.

#### El árbol

- **Cuachalalate**  
Conocido desde antes de la Conquista, su corteza se usó contra úlceras, tumores y hasta dolor de muelas.
- **Distribución**  
El árbol, que mide de seis a diez metros, se localiza en el centro y sur de México.

