



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

COMPUESTOS ANTI-*HELICOBACTER PYLORI* Y  
GASTROPROTECTORES DE LA FRACCIÓN DE ACETATO DE ETILO  
DEL EXTRACTO ACUOSO DE *ARTEMISIA LUDOVICIANA* SUBSP.  
*MEXICANA*.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

Evelyn Berenice Borja Ramírez



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Alejandro Camacho Cruz

**VOCAL:** Profesor: José Fausto Rivero Cruz

**SECRETARIO:** Profesor: Irma Romero Álvarez

**1er. SUPLENTE:** Profesor: Beatriz Ruíz Villafán

**2° SUPLENTE:** Profesor: Mabel Clara Fragoso Serrano

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 2, DEPARTAMENTO DE  
BIOQUÍMICA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**ASESOR DEL TEMA: DRA. IRMA ROMERO ÁLVAREZ**

**SUPERVISOR TÉCNICO: DR. JUAN FRANCISCO PALACIOS ESPINOSA**

**SUSTENTANTE: EVELYN BERENICE BORJA RAMÍREZ**

## ÍNDICE

<b>1. ÍNDICE</b>	<b>1</b>
1.1 Lista de Figuras	5
1.2 Lista de Tablas	7
1.3 Lista de Abreviaturas	8
<b>2. RESUMEN</b>	<b>11</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b>	<b>14</b>
3.1.1 Historia del descubrimiento de <i>H. pylori</i>	14
3.1.2 Taxonomía	16
3.1.3 Vías de transmisión	18
3.1.4 Morfología	19
3.1.5 Hábitat	20
3.1.6 Epidemiología	22
3.1.7 Factores de virulencia	24
3.1.8 Patologías	27
3.1.9 Histopatología	30
3.1.10 Diagnóstico de la infección por <i>H. pylori</i>	32
3.1.11 Tratamiento	34
3.1.12 Resistencia antibiótica en la terapia anti- <i>H. pylori</i>	36

3.1.13 Problemática actual de las terapias anti- <i>H. pylori</i>	39
3.2.1 Uso de las plantas medicinales	40
3.2.2 Plantas medicinales: Una alternativa contra <i>H. pylori</i>	41
3.3.1 Antecedentes directos	42
3.4.1 <i>Artemisia ludoviciana</i> . Generalidades y taxonomía	43
3.4.2 Nombres comunes	44
3.4.3 Sinonimia científica	45
3.4.4 Descripción	45
3.4.5 Distribución	46
3.4.6 Uso Etnomédico	48
3.5.1 Información Fitoquímica	48
3.5.2 Estudios previos de actividades biológicas de <i>A. ludoviciana</i>	50
<b>4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS</b>	<b>52</b>
4.1.1 Justificación	52
4.1.2 Objetivos generales y particulares	54
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>55</b>
5.1.1 Material vegetal	55
5.1.2 Preparación y fraccionamiento primario de ALI	55

5.2 Fraccionamiento, aislamiento y caracterización de la flavona Eupatilina	56
5.2.1 Fraccionamiento secundario y terciario de ALI-2	56
5.3 Ensayos biológicos <i>IN VIVO</i>	57
5.3.1 Animales de experimentación	57
5.3.2 Evaluación de la actividad gastroprotectora	58
5.3.3 Evaluación de la actividad antiinflamatoria	59
5.3.3.1 Administración de los tratamientos mediante la vía tópica	59
5.3.3.2 Administración de los tratamientos mediante la vía oral	60
5.4 Ensayos biológicos <i>IN VITRO</i>	61
5.4.1 Cultivo de <i>H. pylori</i>	61
5.4.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	61
5.4.3 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)	63
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>65</b>
6.1. 1ª Parte: Evaluación de la actividad gastroprotectora y antiinflamatoria de ALI y sus fracciones primarias	66
6.1.1 Evaluación de la actividad gastroprotectora de las fracciones primarias de ALI	66

6.1.2 Evaluación de la actividad antiinflamatoria de ALI y sus fracciones primarias	69
6.2.1 2ª Parte: Fraccionamiento biodirigido de la fracción ALI-2	73
6.2.1.1 Fraccionamiento secundario de ALI-2	73
6.2.1.2 Actividad anti- <i>H.pylori</i>	76
6.2.1.3 Actividad gastroprotectora	78
6.2.1.4 Fraccionamiento terciario de ALI-2	80
6.2.1.5 Análisis de la fracción C4	84
6.2.1.6 Eupatilina	86
6.2.1.7 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de la flavona eupatilina	88
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>91</b>
<b>8. PERSPECTIVAS</b>	<b>93</b>
<b>9. ANEXOS</b>	<b>94</b>
ANEXO I. Placas y medios para el cultivo de <i>H. pylori</i>	94
ANEXO II. Pruebas de Identificación de <i>H. pylori</i>	95
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>96</b>

## 1.1 Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Barry Marshall y Robin Warren	15
<b>Figura 2.</b> Micrografías donde se muestra la morfología de <i>H. pylori</i>	20
<b>Figura 3.</b> Distribución de proporciones de mortalidad de cáncer gástrico y la seroprevalencia de <i>H. pylori</i> en México	23
<b>Figura 4.</b> Factores de virulencia involucrados en la colonización de <i>H. pylori</i>	26
<b>Figura 5.</b> Representación esquemática del estómago	29
<b>Figura 6.</b> Inflamación de la mucosa gástrica asociada a <i>H. pylori</i>	31
<b>Figura 7.</b> Reacción de la ureasa, sobre la cual se basa la prueba de detección rápida del mismo nombre	33
<b>Figura 8.</b> Antibióticos más utilizados para la erradicación de <i>H. pylori</i>	39
<b>Figura 9.</b> <i>Artemisia ludoviciana</i> subsp. mexicana (Willd. ex Spreng.) D.D. Keck.	46
<b>Figura 10.</b> Distribución de <i>A. ludoviciana</i>	47
<b>Figura 11.</b> Fraccionamiento del extracto acuoso de <i>A. ludoviciana</i> (ALI) y sus correspondientes fracciones primarias obtenidas mediante particiones líquido-líquido	56
<b>Figura 12.</b> Efecto gastroprotector del extracto acuoso y fracciones primarias de <i>A. ludoviciana</i> subsp. mexicana (ALI) en el modelo de úlceras agudas inducidas con etanol absoluto en ratones	68
<b>Figura 13.</b> Fracciones secundarias de ALI-2	74

- Figura 14.** Cromatografía en capa fina (CCF) de ALI-2 (A) y sus fracciones secundarias 75
- Figura 15.** Efecto gastroprotector de las fracciones C, D, E y F (30 mg/kg) en el modelo de inducción de úlceras agudas con etanol absoluto en ratones 79
- Figura 16.** Cromatografía en capa fina (CCF) de las fracciones terciarias de C 80
- Figura 17.** Efecto gastroprotector de ALI-2 (100 mg/kg, *p.o.*), C y C.4 (30 mg/kg, *p.o.*) en el modelo de inducción de úlceras agudas con etanol absoluto en ratones 83
- Figura 18.** Muestra del compuesto aislado (eupatilina) 84
- Figura 19.** Asignación de los correspondientes espectros de RMN-  $^1\text{H}$  de la eupatilina 85
- Figura 20.** Asignación de los correspondientes espectros de RMN-  $^{13}\text{C}$  de la eupatilina 85
- Figura 21.** Actividad bactericida de la flavona eupatilina sobre *H. pylori* 89

## 1.2 Lista de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Especies del género <i>Helicobacter</i> descritas en la literatura	17
<b>Tabla 2.</b> Modelos animales de investigación en patologías relacionadas con <i>H. pylori</i>	21
<b>Tabla 3.</b> Medicamentos empleados en las terapias de erradicación de <i>H. pylori</i>	35
<b>Tabla 4.</b> Clasificación de <i>A. ludoviciana</i>	44
<b>Tabla 5.</b> Metabolitos identificados en el estafiate	49
<b>Tabla 6.</b> Estudios previos de <i>A. ludoviciana</i>	50
<b>Tabla 7.</b> Actividad antiedematogénica de ALI y sus fracciones primarias	70
<b>Tabla 8.</b> Fraccionamiento secundario y mezclas de disolventes utilizadas en la CCA de gel de sílice	74
<b>Tabla 9.</b> Rendimientos de las fracciones secundarias de ALI-2	75
<b>Tabla 10.</b> Actividad anti- <i>H. pylori</i> de ALI, ALI-2, sus fracciones secundarias (A, B, C, D, E y F) y antibióticos de referencia (metronidazol, claritromicina y amoxicilina)	77
<b>Tabla 11.</b> Actividad anti- <i>H. pylori</i> y rendimientos de las fracciones terciarias provenientes de la fracción secundaria C	81
<b>Tabla 12.</b> Identificación de eupatilina en plantas del género <i>Artemisia</i>	87
<b>Tabla 13.</b> Identificación de eupatilina en otras plantas	87

### 1.3 Lista de Abreviaturas

<b>A</b>	Absorbencia
<b>AE</b>	Acetato de Etilo
<b>ALI</b>	Extracto acuoso de <i>Artemisia ludoviciana</i> subsp. mexicana
<b>ALI-1</b>	Fracción de diclorometano de ALI
<b>ALI-2</b>	Fracción de acetato de etilo de ALI
<b>ALI-3</b>	Fracción butanólica de ALI
<b>ALI-4</b>	Fracción acuosa residual de ALI
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ANOVA</b>	Análisis de Varianza
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARN r</b>	Ácido ribonucleico ribosomal
<b>ARN t-aa</b>	Ácido ribonucleico de transferencia aminoacil
<b>BabA<sub>2</sub></b>	Adhesina de unión al antígeno de los grupos sanguíneos A, B y O
<b>cag A</b>	Gen que codifica para la proteína Cag A
<b>Cag A</b>	Proteína asociada al gen A
<b>cag-PAI</b>	Isla de patogenicidad <i>cag</i>
<b>CAR</b>	Carbenoxolona
<b>CCA</b>	Cromatografía de Columna Abierta
<b>CCF</b>	Cromatografía de Capa Fina

<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>CMB</b>	Concentración Mínima Bactericida
<b>CMI</b>	Concentración Mínima Inhibitoria
<b>COX</b>	Ciclooxigenasa
<b>DE</b>	Desviación Estándar
<b>DE<sub>50</sub></b>	Dosis Efectiva Media
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dosis Letal Media
<b>DM</b>	Diclorometano
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>ERO</b>	Especies Reactivas de Oxígeno
<b>IARC</b>	Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer
<b>IBP</b>	Inhibidor de la Bomba de Protones
<b>IL</b>	Interleucina
<b>INEGI</b>	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática
<b>INI</b>	Instituto Nacional Indigenista
<b><i>i.p.</i></b>	Vía intraperitoneal
<b>IU</b>	Índice de Úlcera
<b>M</b>	Metanol
<b>MALT</b>	Tejido Linfoide Asociado a Mucosa
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PBP</b>	Proteínas de Unión a Penicilina

<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>PG</b>	Prostaglandinas
<b>p.o.</b>	Vía oral
<b>PMN</b>	Polimorfonucleares
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>SabA</b>	Adhesina de unión al ácido siálico
<b>SEM</b>	Error Estándar de la Media
<b>SSI</b>	Solución de NaCl al 0.9%
<b>subsp.</b>	subespecie
<b>Th-1</b>	Linfocito T colaborador 1
<b>TNF</b>	Factor de Necrosis Tumoral
<b>TPA</b>	Tetradecanoil-forbol
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colonias
<b>VEH</b>	Vehículo
<b>ure A</b>	Gen que codifica para la subunidad A de la ureasa
<b>ure B</b>	Gen que codifica para la subunidad B de la ureasa
<b>VacA</b>	Citotoxina vacuolizante A
<b>%C</b>	Porcentaje de crecimiento bacteriano
<b>%G</b>	Porcentaje de Gastroprotección
<b>%I</b>	Porcentaje de inhibición del crecimiento
<b>%IE</b>	Porcentaje de Inhibición del Edema

## 2. RESUMEN

A partir de que se declara a *H. pylori* como el principal agente etiológico de la gastritis crónica activa, úlcera péptica y considerarse un factor de predisposición del carcinoma gástrico; se han planteado varios criterios para su erradicación. Los tratamientos son complejos (dos antibióticos y un inhibidor de la bomba de protones) y conllevan efectos secundarios perjudiciales que hacen que los pacientes no los terminen, permitiendo la aparición de resistencia a los antibióticos comerciales. Por otra parte, se presenta reincidencia de la enfermedad en pacientes que han tenido un tratamiento previo y siguen viviendo bajo las mismas condiciones en las que se infectaron. Tomando en cuenta todos los problemas de las terapias actuales, surge la necesidad de la búsqueda de nuevos antibióticos y terapias para el tratamiento de las enfermedades producidas por *H. pylori*.

Esta búsqueda ha llevado a indagar en las fuentes naturales, entre ellas, las vegetales. Las plantas medicinales han representado fuentes importantes de metabolitos secundarios útiles en el desarrollo de nuevos medicamentos para el tratamiento de distintos padecimientos. En este trabajo de tesis enfocamos nuestra atención en la planta *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana*, cuya infusión ha sido empleada en la medicina tradicional mexicana para tratar diversos trastornos gastrointestinales.

En particular, se estudiaron las actividades anti-inflamatoria y anti-ulcerosa del extracto acuoso de la planta y de fracciones primarias obtenidas por particiones sucesivas y, por otra parte, se llevó a cabo un asilamiento biodirigido por la actividad anti- *H. pylori* y gastroprotectora de la fracción primaria de acetato de etilo.

En cuanto a la actividad antiulcerosa, se utilizó el modelo de úlcera aguda inducida por etanol absoluto en ratón (Bucciarelli *et al.*, 2007). Los resultados mostraron que la fracción primaria de acetato de etilo del extracto acuoso de *A. ludoviciana* presentó el mejor efecto antiulcerogénico con un porcentaje de Gastroprotección del 83% a una dosis de 100 mg/kg. La evaluación del potencial antiinflamatorio del extracto acuoso de *A. ludoviciana* y sus fracciones primarias se realizó empleando el modelo del edema auricular agudo en ratón (De Young *et al.*, 1989), administrando los tratamientos mediante vía oral y vía tópica y utilizando como agentes edematogénicos al xilol y tetradecanoil-forbol (TPA). La tendencia general de los resultados indica que el efecto antiinflamatorio es menor cuando se aplican las muestras de manera tópica que cuando se administra oralmente. La administración oral del extracto presenta un efecto anti-inflamatorio de moderado a bueno al evaluarse con xilol con un porcentaje de inhibición del  $47.3 \pm 6.9\%$  y de  $47.6 \pm 12.4\%$  a las dosis de 30 y 100 mg/kg, respectivamente; mientras que en el modelo con TPA solo a la dosis de 100 mg/kg se presentó un efecto antiedematogénico ( $69.2 \pm 4.4\%$ ).

En cuanto al fraccionamiento biodirigido por las actividades antibacteriana y gastroprotectora de la fracción de acetato de etilo (ALI-2), se logró el aislamiento e identificación de la flavona eupatilina, la cual presentó una buena actividad anti-*H. pylori* (**Concentración Mínima Inhibitoria** de  $31.2 \mu\text{g/mL}$  y **Concentración Mínima Bactericida** de  $30 \mu\text{g/mL}$  en 24 h) y un porcentaje de gastroprotección alto (92%).

Este trabajo aporta evidencias de la actividad gastroprotectora y anti-*H. pylori* de la eupatilina y a su vez establece las bases científicas para en un futuro implementar su utilización como parte de la terapia contra la infección por *H. pylori*.

Por otra parte, contribuye en aumentar el conocimiento de *Artemisia ludoviciana* subsp. mexicana en validar el uso etnomédico de la especie, y establece un parteaguas acerca del gran potencial que tiene ésta planta para tratar los padecimientos relacionados con *H. pylori*.

### **3. INTRODUCCIÓN**

#### **3.1.1 Historia del descubrimiento de *Helicobacter pylori***

A finales del siglo XIX empiezan a aparecer reportes acerca de la presencia de microorganismos colonizando la mucosa del estómago, entre ellos tenemos el del anatomista italiano G. Bizzozero, quien identificó organismos en forma de espiroqueta en muestras de mucosa gástrica de perros (Bizzozero, 1893). Posteriormente, Steer en 1975, mientras estudiaba la migración de leucocitos polimorfonucleares (PMN) en biopsias obtenidas de la mucosa gástrica de pacientes con úlcera gástrica, logró identificar bacterias que estaban en estrecho contacto con el epitelio gástrico y sugirió que la migración de PMN se presentaba en respuesta a la presencia de dichas bacterias (Steer, 1975).

En 1982, los médicos australianos Warren y Marshall publicaron sus primeros informes donde establecen la relación de una bacteria en forma de "S" semejante a las del género *Campylobacter*, con los cambios histológicos presentados en biopsias gástricas obtenidas de pacientes con gastritis y úlcera péptica (Warren y Marshall, 1984). Con el objetivo de corroborar que el microorganismo era el agente causal de estas patologías, Warren y Marshall decidieron comprobar si se cumplían los postulados de Koch. Primeramente lograron aislar dicha bacteria de las biopsias gástricas y cultivarla, posteriormente, era necesario demostrar que podía colonizar la mucosa normal e inducir gastritis, para lo cual Marshall decidió ser su propio conejillo de indias e ingirió la bacteria logrando desarrollar los síntomas característicos de los pacientes, tales como dolor de cabeza, dolor abdominal, náuseas y vómitos. Finalmente, con la ayuda de una endoscopia y estudios histológicos, comprobaron la inflamación de la mucosa gástrica de

Marshall y la presencia del microorganismo, logrando establecer de esta forma la relación bacteria-enfermedad (Marshall *et al.*, 1985).

A partir de ese momento, la comunidad científica se centró en estudiar a la bacteria, la cual renombraron *Helicobacter pylori*, y en confirmar experimentalmente los resultados de los investigadores australianos de diversas maneras.

En 1994, la Conferencia Consenso del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de América, declaró a *H. pylori* como el principal agente causal de la úlcera péptica y en ese mismo año, la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) declara a la bacteria como un cancerígeno del grupo 1 (IARC, 1994; NIH, 1994), esto significa que existen pruebas experimentales suficientes de que esta bacteria puede causar cáncer gástrico. Finalmente, en el año 2005, Warren y Marshall fueron galardonados con el Premio Nobel de medicina y fisiología por el descubrimiento de la bacteria *H. pylori* así como su relación con la gastritis y la úlcera péptica.



**Figura 1. Barry Marshall (izquierda) y Robin Warren (derecha).** Consultado de [www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2005/#](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2005/#), 11 de Noviembre del 2012.

### 3.1.2 Taxonomía

Inicialmente se denominó a este microorganismo *Campylobacter pyloridis* (Marshall *et al.*, 1984) debido a su morfología curvada, su crecimiento en medios ricos, condiciones microaerofílicas, incapacidad para fermentar glucosa, sensibilidad al metronidazol y el contenido de G-C de su ADN (34%). Posteriormente, debido a las reglas internacionales de la nomenclatura se cambió a *Campylobacter pylori* (Marshall y Goodwin, 1987). Sin embargo, estudios de taxonomía molecular mediante secuenciamiento del ARN ribosómico y de hibridación ADN-rARN, además de estudios ultraestructurales, de composición de ácidos grasos, de sus menaquinonas respiratorias y de sus capacidades enzimáticas, demostraron que esta bacteria presentaba una posición filogenética diferente a las especies de *Campylobacter*, permitiendo la creación del género *Helicobacter* en 1989 (Goodwin *et al.*, 1989; Vandamme *et al.*, 1991; Vandamme y Goosens, 1992; Kielbauch *et al.*, 1994).

De acuerdo a Skirrow y considerando su hábitat o lugar inicial de colonización, las especies de *Helicobacter* pueden ser separadas en dos grandes grupos, aquellas que colonizan la mucosa gástrica (*Helicobacter* gástricos) y aquellas cuyo hábitat preferencial lo constituye la mucosa intestinal y/o las vías biliares (*Helicobacter* enterohepáticos) (Skirrow, 1994).

Actualmente, el género *Helicobacter* está constituido por 38 especies, las cuales se indican en la Tabla 1.

**Tabla 1. Especies del género *Helicobacter* descritas en la literatura.**

<b>BACTERIAS</b>		
<b>ESPECIES GÁSTRICAS</b>	<i>H. pylori</i> *	<i>H. salomonis</i> *
	<i>H. felis</i> *	<i>H. suis</i> *
	<i>H. mustelae</i>	<i>H. bovis</i>
	<i>H. acinonichis</i>	<i>H. suncus</i>
	<i>H. bizzozeronii</i> *	<i>H. cyanogastricus</i>
	<i>H. cetoreum</i>	<i>H. aurati</i>
	<i>H. heilmannii</i> *	
<b>ESPECIES ENTEROHEPÁTICAS</b>	<i>H. hepaticus</i> *	<i>H. anseris</i>
	<i>H. fennelliae</i> *	<i>H. brantae</i>
	<i>H. cinaedi</i> *	<i>H. equorum</i>
	<i>H. trogontum</i>	<i>H. ganmani</i>
	<i>H. canadensis</i> *	<i>H. mastomyrnus</i>
	<i>H. bilis</i>	<i>H. marmotae</i>
	<i>H. cholecystus</i>	<i>H. mesocricetorum</i>
	<i>H. muridarum</i>	<i>H. magdeburgensis</i>
	<i>H. pametensis</i>	<i>H. rodentium</i>
	<i>H. pullorum</i> *	<i>H. suncus</i>
	<i>H. typhlonicus</i>	<i>H. westmeadii</i> *
	<i>H. winghamensis</i> *	<i>H. rappini</i> *
	<i>H. canis</i> *	

\*Especies aisladas del ser humano (Kusters *et al.*, 2006; Hannula y Hänninen, 2007; Fernández, 2012).

Filogenéticamente el género *Helicobacter* (del griego: *helix*, helicoidal; *bacter*, bacteria), pertenece a la división *Proteobacteria*, clase *Epsilonbacteria*, familia *Helicobacteraceae*, género *Helicobacter*, siendo la especie tipo *Helicobacter pylori*. (Consultado en [www.the-icsp.org/](http://www.the-icsp.org/), 11 de Noviembre del 2012).

### 3.1.3 Vías de transmisión

En la actualidad las vías de transmisión de *H. pylori* no se han establecido concretamente. Se sabe que el único reservorio de la bacteria es el estómago humano (Megraud y Broutet, 2000), por lo que se piensa que la transmisión de la bacteria ocurre de persona a persona o mediante un factor ambiental en común. Hay evidencias que apoyan la existencia de tres vías de transmisión de la bacteria (gastro-oral, fecal-oral y oral-oral) pero no hay información concluyente que apoye la predominancia de alguna de las mismas (Kusters *et al.*, 2006; Azevedo *et al.*, 2009).

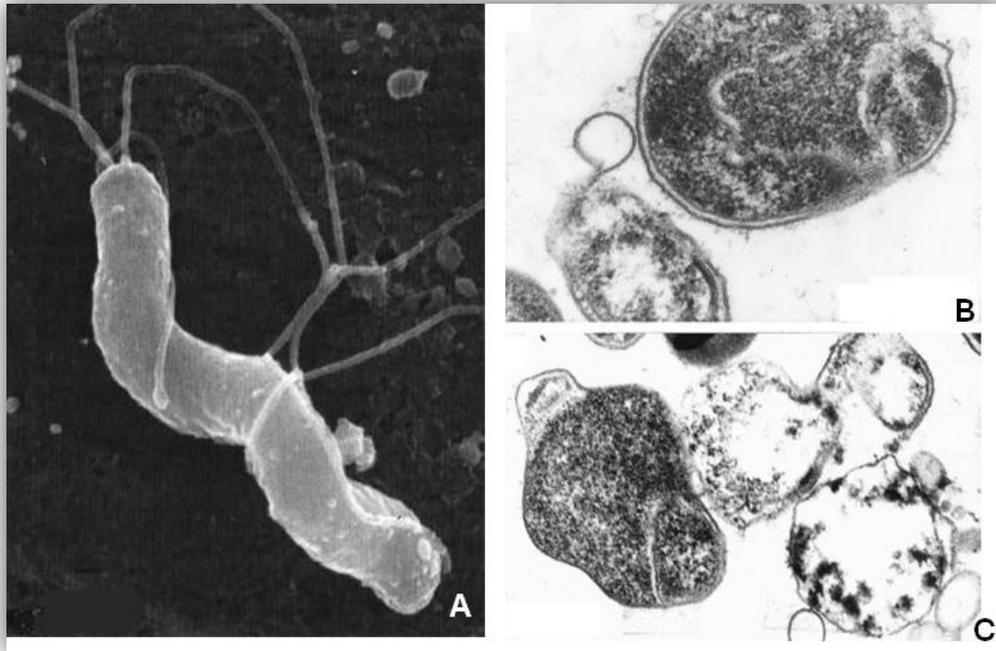
- ❖ **Vía gastro-oral.** *H. pylori* se adquiere comúnmente a una edad temprana y los vómitos de los niños son un vehículo para la transmisión de la bacteria debido a que contienen jugo gástrico (Axon, 1995). Ha sido posible aislar la bacteria del jugo gástrico de pacientes sintomáticos (Okuda *et al.*, 1996; Galal *et al.*, 1997) y de vómito (Leung *et al.*, 1999; Parsonnet *et al.*, 1999).
- ❖ **Vía oral-oral.** La saliva es otra posible fuente de transmisión de *H. pylori*, ya que la flora gástrica puede alcanzar y colonizar la boca después de regurgitación y vómitos (Vale y Vitor, 2010). Se ha logrado la amplificación de ADN de *H. pylori* de la saliva (Mapstone *et al.*, 1993; Shimada *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1995; Namavar *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1996; Leung *et al.*, 1999) y de la

placa dental (Burgers *et al.*, 2008; Souto y Colombo, 2008). *H. pylori* también ha sido cultivada directamente a partir de saliva (Ferguson *et al.*, 1993; Parsonnet *et al.*, 1999).

- ❖ **Vía fecal-oral.** Se ha detectado ADN de *H. pylori* en heces humanas (Oyofó *et al.*, 1992; Gramley *et al.*, 1999; Monteiro *et al.*, 2001; Fujimura *et al.*, 2004; Queralt *et al.*, 2005; Sen *et al.*, 2005). El agua puede ser un intermediario en la transmisión fecal-oral, actuando como un reservorio en el cual la bacteria puede permanecer por períodos prolongados antes de ser ingerida como agua potable, accidentalmente durante el baño o a través de alimentos contaminados (Fujimura *et al.*, 2008; Azevedo *et al.*, 2009).

### 3.1.4 Morfología

*H. pylori* es una bacteria Gram negativa y polimórfica. La forma curvada es la que predomina cuando la bacteria se encuentra en condiciones óptimas de crecimiento, mientras que, la forma de coco es inducida por estrés ambiental, como pH alcalino, temperatura elevada, aumento en la concentración de oxígeno, cultivo prolongado o en presencia de antibióticos. *H. pylori* mide aproximadamente 2 a 4  $\mu\text{m}$  de largo y 0.5 a 1  $\mu\text{m}$  de ancho (Figura 2). Posee de 2 a 6 flagelos unipolares de 3  $\mu\text{m}$  de longitud aproximadamente, los cuales le confieren motilidad y le permiten penetrar rápidamente a través del moco que cubre las células epiteliales gástricas (Jones *et al.*, 1987; Kusters *et al.*, 2006) facilitando así la colonización del estómago (Eaton *et al.*, 1992).



**Figura 2. Micrografías donde se muestra la morfología de *H. pylori*.** a) Morfología clásica en forma de espiral; b) Formación inicial de las formas coccoides; c) Conversión a la forma cocoide (Tomadas de O'Rourke y Bode, 2001).

### 3.1.5 Hábitat

Aproximadamente el 20% de las bacterias *H. pylori* se encuentran adheridas a la superficie de la mucosa del epitelio gástrico en el humano específicamente a la región del píloro y antro, el resto se encuentra localizado en la capa de moco que cubre al epitelio y sólo unas pocas se internalizan en las células (Kusters *et al.*, 2006, Amieva y El-Omar, 2008).

Se ha reportado la capacidad de la bacteria para colonizar otros organismos, como ciertos grupos de monos, perros y gatos (Fox y Lee, 1997). Existen también diversos modelos animales que se utilizan para estudiar patologías relacionadas con la bacteria, como se indica en la Tabla 2.

<b>Tabla 2. Modelos animales de investigación en patologías relacionadas con <i>H. pylori</i>.</b>		
<b>Modelo Animal</b>	<b>Patologías</b>	<b>Referencia</b>
<b>Ratón</b>	Gastritis linfocítica	O'Rourke y Lee, 2003. Kodama <i>et al.</i> , 2004. Pritchard y Przemec, 2004.
<b>Jerbo</b>	Úlcera péptica, metaplasia intestinal	Hirayama <i>et al.</i> , 1996. Matsumoto <i>et al.</i> , 1997. Honda <i>et al.</i> , 1998.
	Adenocarcinoma gástrico	Honda <i>et al.</i> , 1998. Shimizu <i>et al.</i> , 1999. Sugiyama <i>et al.</i> , 1998. Wang y Fox, 1998. Watanabe <i>et al.</i> , 1998. Franco <i>et al.</i> , 2005.
<b>Cerdo</b>	Gastritis	Eaton y Krakowka, 1992.
	Úlcera gástrica y linfoma de MALT	Krakowka <i>et al.</i> , 1995. Krakowka <i>et al.</i> , 1996. Green <i>et al.</i> , 1997.
<b>Primates (no humanos)</b>	Gastritis y gastritis atrófica	Harris <i>et al.</i> , 2000. Mattapallil <i>et al.</i> , 2000. Murakami <i>et al.</i> , 2002. Oda <i>et al.</i> , 2002.

En condiciones *in vitro* la bacteria requiere medios artificiales que contengan nutrientes como peptona, triptona, extracto de levadura, glucosa, suplementados con sangre y suero fetal bovino. También necesita de condiciones microaerófilas con una concentración de 10% de CO<sub>2</sub> y alrededor de 5% de O<sub>2</sub>. Es de lento crecimiento (3 a 7 días) y

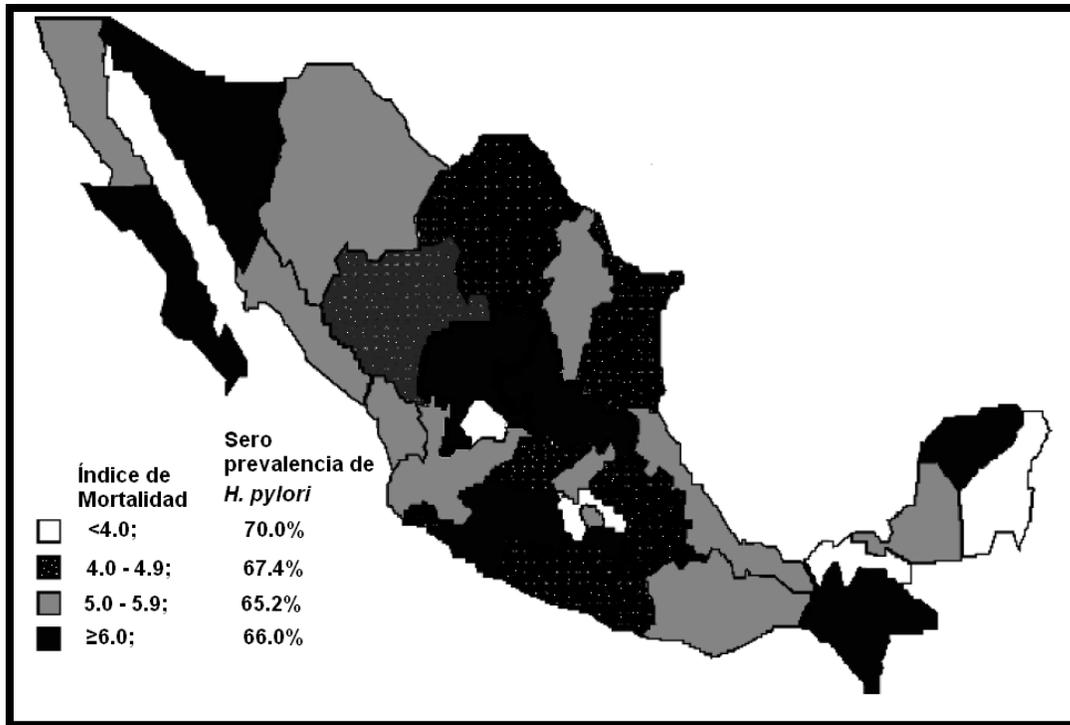
en medios sólidos las colonias son pequeñas y translúcidas (Dehesa, 1993).

### 3.1.6 Epidemiología

*H. pylori* coloniza el estómago de la mitad de la población mundial aproximadamente. Más del 70% de dicha población infectada permanece asintomática. La infección se adquiere principalmente durante la infancia (Sykora *et al.*, 2006). La prevalencia de la infección es mayor en los países en desarrollo (mayor al 80%) y más baja en países desarrollados (menor al 40%) (Perez-Perez *et al.*, 2004; Kusters *et al.*, 2006). Sin embargo, la prevalencia varía dentro de la subpoblación específica de un mismo país (Bruce y Maaros, 2008), principalmente por las diferencias socioeconómicas entre las subpoblaciones (OMG, 2010).

En México, la infección se adquiere a edades tempranas. Torres y colaboradores en 1998, determinaron una seroprevalencia del 70% para *H. pylori* en una muestra de 11,605 personas de entre 1 y 90 años de edad procedente de todo el país; alcanzando un 80% en adultos jóvenes de entre 18 y 20 años de edad, con una tasa de incremento del 5% anual durante los primeros años de vida. Estos investigadores correlacionaron sus resultados con la tasa de mortalidad de cáncer gástrico dividiendo al país en cuatro grupos como se indica en la Figura 3. En Aguascalientes, Quintana Roo, Tabasco y Tlaxcala se presenta el índice de mortalidad por cáncer gástrico más bajo (<4%), pero se encuentra el índice más alto de infección por *H. pylori* (70%). Por otro lado, en Baja California Sur, Chiapas, Coahuila, Guerrero, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, Yucatán y Zacatecas, existe un índice de mortalidad más alto por cáncer gástrico ( $\geq 6.0\%$ ) con una seroprevalencia del 66%.

De acuerdo a los autores estos datos se correlacionan de acuerdo al desarrollo económico, ya que los estados del norte tienen un índice más alto de mortalidad por cáncer gástrico que aquellos del sur, que tienen el desarrollo económico más bajo (Torres *et al*, 2005).



**Figura 3. Distribución de proporciones de mortalidad de cáncer gástrico y la seroprevalencia de *H. pylori* en México.**

En el III Consenso Mexicano sobre *H. pylori* se identificó que se presenta infección por esta bacteria en el 90% de personas con cáncer gástrico y entre el 85-90% de sujetos con úlcera péptica.

En el año 2005, el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) registró a los tumores malignos como la tercera causa de muerte en México, de los cuales el cáncer de estómago ocupó

la tercer causa de muerte en varones con una tasa de mortalidad de 9.1%, mientras en las mujeres fue la cuarta causa de muerte por tumores malignos con una tasa de mortalidad de 7.8%. (Consultado de [www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2007/cancer07.pdf](http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2007/cancer07.pdf), 12 de Noviembre del 2012).

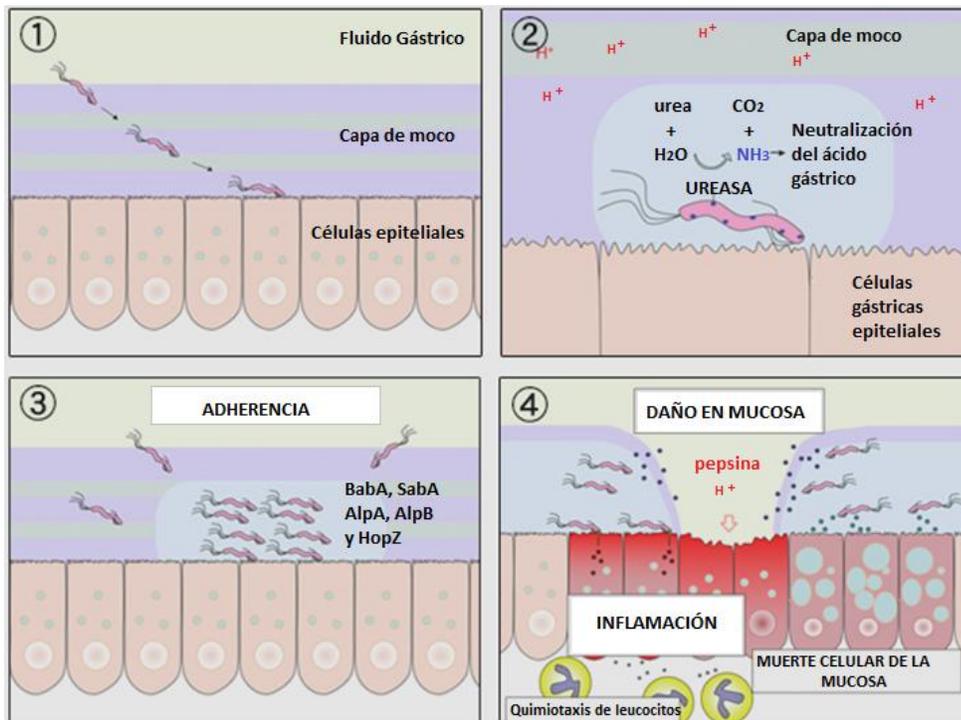
### 3.1.7 Factores de Virulencia

*H. pylori* posee factores y mecanismos que le permiten adaptarse, vivir y colonizar el estómago humano, los cuales se pueden clasificar en tres tipos:

- a) **Factores de colonización gástrica.** La bacteria posee diversos mecanismos que la ayudan a evadir el pH ácido del estómago como la enzima ureasa que hidroliza la urea en CO<sub>2</sub> y NH<sub>4</sub>, neutralizando así el microambiente que le rodea durante su colonización. Por otra parte, los flagelos le confieren motilidad para resistir las contracciones musculares de vaciamiento gástrico y a disminuir el tiempo de exposición al medio ácido del lumen permitiéndole llegar al epitelio gástrico y colonizarlo (Amieva y El-Omar, 2008). La bacteria también posee adhesinas en la membrana externa que le permite iniciar los procesos de virulencia al adherirse a las células epiteliales, las más estudiadas son la adhesina A (BabA2), de unión al antígeno de grupos sanguíneos A, B y O (Ilver *et al.*, 1998; Aspholm-Hurting *et al.*, 2004) y la adhesina de unión al ácido siálico SabA (Ilver *et al.*, 1998; Mahdavi *et al.*, 2002).

**b) Factores involucrados en la inflamación y daño al tejido gástrico.** Dentro de estos factores se encuentran las enzimas fosfolipasa A, la alcohol deshidrogenasa, el lipopolisacárido; así como proteínas proinflamatorias de la superficie del epitelio, que activan células inflamatorias como macrófagos y neutrófilos (Falkow, 1997). Otro factor de virulencia es la citotoxina vacuolizante VacA, la cual produce vacuolas en las células del epitelio gástrico conduciendo a la destrucción de la mucosa, dicho factor se encuentra fuertemente relacionado con el cáncer gástrico (Xiang *et al.*, 1995). Otro factor determinante en la patogenicidad de la bacteria es la isla de patogenicidad *cag*-PAI, la cual es un conjunto de alrededor de 30 genes con un elevado polimorfismo. El 60% de las cepas de *H. pylori* producen proteínas codificadas por esta isla y se denominan como *cagA*<sup>+</sup>. La proteína CagA, es sin duda una de las más importantes de la isla, induce la producción de interleucina 8 (IL-8) y del factor de necrosis tumoral (TNF) con la subsecuente estimulación de la respuesta inflamatoria. Las cepas *cagA*<sup>+</sup> son más virulentas que las *cagA*<sup>-</sup> y juegan un papel sumamente importante en el desarrollo de la gastritis atrófica, úlcera péptica y cáncer gástrico (Higashi *et al.*, 2002; Maeda *et al.*, 1998).

**c) Factores de sobrevivencia.** La bacteria posee a las enzimas superóxido dismutasa y catalasa, ambas evitan la acción de las especies reactivas de oxígeno (ERO) liberadas por los fagocitos, como respuesta ante la infección bacteriana (Hazell *et al.*, 1991; Spigelhalter *et al.*, 1993). También, se encuentran las formas cocoides, las cuales se presentan en cultivos viejos o cuando las condiciones del medio son desfavorables para la bacteria. Aunque se discute mucho acerca de su viabilidad, estas estructuras podrían darle una ventaja para permanecer en un estado de latencia, del cual podría salir cuando las condiciones vuelven a ser favorables. Se ha reportado que la forma cocoide es capaz de reinfectar ratones, por lo que podría también ser un medio de transmisión (Wang *et al.*, 1997).



**Figura 4. Factores de virulencia de *H. pylori*.** 1) La bacteria penetra la capa de moco y migra a la superficie de las células epiteliales, 2) el amoníaco producido por la ureasa neutraliza el ácido gástrico alrededor de la bacteria, 3) la adherencia al epitelio gástrico mediante las adhesinas (BabA, SabA, AlpA, AlpB y HopZ) y 4) destrucción de la mucosa, inflamación y muerte celular. (Tomada y modificada de [www.macroevolution.net/stomach-bacteria.html](http://www.macroevolution.net/stomach-bacteria.html)).

### 3.1.8 Patologías

La colonización de *H. pylori* en el estómago no es una enfermedad por sí sola, sin embargo es una condición que aumenta el riesgo de desarrollar diversos trastornos clínicos del tracto gastrointestinal (Kusters *et al.*, 2006). Las principales patologías relacionadas con *H. pylori* son gastritis aguda, gastritis crónica, úlcera péptica, cáncer gástrico y linfoma de MALT (Tejido Linfoide Asociado a Mucosa), cuyas características se describen a continuación:

#### ❖ **Gastritis aguda.**

La fase inicial de la infección es subclínica en la mayoría de las personas. Después de la ingestión, las bacterias penetran a través del moco viscoso que cubre el epitelio gástrico y se multiplican en la superficie de las células. El epitelio responde a la infección con el agotamiento de mucina, la exfoliación celular y cambios regenerativos compensatorios (Dixon, 2001). También en ésta fase se liberan lipopolisacáridos bacterianos (Slomiany *et al.*, 1998) y restos que actúan como mediadores quimiotácticos, que penetran a través de la superficie del epitelio dañado e inducen la migración de leucocitos polimorfonucleares (PMN) al epitelio gástrico. En ésta fase se presentan síntomas como sensación de saciedad, náuseas, vómitos, inflamación de la mucosa distal y proximal de estómago e hipoclorhidria que puede durar meses (Kusters *et al.*, 2006). La fase aguda es de corta duración y en una pequeña parte de la población, sobretudo en la infancia, los organismos pueden eliminarse de manera espontánea. En la mayoría, sin embargo, la respuesta inmune del huésped no puede eliminar la infección así que en las siguientes 3 o 4 semanas hay una acumulación gradual de células inflamatorias que dominan el cuadro histológico. Como consecuencia a lo anterior, la gastritis aguda evoluciona a gastritis

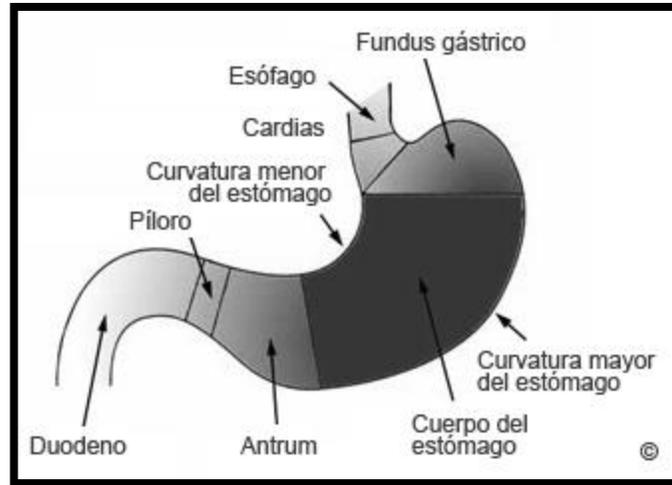
crónica activa (Sobala *et al.*, 1991).

❖ **Gastritis crónica.**

Se caracteriza por la llegada de linfocitos y células plasmáticas a la mucosa lo que desencadena un aumento de la respuesta inflamatoria aguda por la producción de citocinas y anticuerpos específicos anti-*H. pylori*. Sin embargo, esta respuesta exagerada falla para eliminar la infección y la continua presencia de la bacteria conduce a la respuesta de una segunda línea de defensa, que implica el reclutamiento de células B cebadas en los folículos linfoides con la producción de células plasmáticas y la síntesis de IgA. Cuando llega a este nivel la respuesta inmune es insuficiente para erradicar la bacteria en la mayoría de los casos y si la aparición de los folículos linfoides continúa, ya se habla de una gastritis crónica activa (Dixon, 2001).

❖ **Úlcera péptica.**

Las úlceras son lesiones en la mucosa con un diámetro de aproximadamente 0.5 cm, las cuales penetran la submucosa. Se caracteriza por presentarse en la región antral del estómago, con niveles de gastrina elevada y problemas con la regulación de la secreción ácida. Existen dos tipos, las úlceras gástricas que se presentan en su mayoría a lo largo de la curvatura menor del estómago, es decir, en la transición del antro al cuerpo y las úlceras duodenales que se presentan en el bulbo duodenal (Figura 5), que es el área más expuesta al ácido gástrico. Se ha asociado a *H. pylori* con el 95% de las úlceras duodenales y con el 85% de las gástricas (Kusters *et al.*, 2006). El riesgo de desarrollar úlceras entre la población infectada con la bacteria es del 10-15% (Logan y Walker, 2001). Existen complicaciones de las úlceras que incluyen perforación del tejido y hemorragia digestiva (Kusters *et al.*, 2006).



**Figura 5. Representación esquemática del estómago.**  
(Tomado de [www.onmeda.es](http://www.onmeda.es), 04 de Enero del 2013)

#### ❖ **Cáncer gástrico.**

El cáncer gástrico es una de las neoplasias más comunes en el mundo, siendo la 4ª neoplasia maligna más común y la 2ª causa de muerte por cáncer (1 millón de muertes/año), ambos marcadores a nivel mundial, siendo el adenocarcinoma del estómago el tumor más frecuente (95%) (Talley *et al.*, 2008). La asociación entre *H. pylori* y cáncer gástrico atrajo gran interés a nivel mundial principalmente cuando la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC), una organización subordinada de la OMS, identificó a la bacteria como carcinógeno del grupo 1 en 1994 (Dixon, 2001). Existen dos posibles mecanismos por los que se asocia a *H. pylori* con el cáncer gástrico, el primer mecanismo se basa en el establecimiento de un entorno carcinogénico debido a la infección a largo plazo y en el segundo caso, corresponde a una infección prolongada por la bacteria y a una inflamación de la mucosa gástrica, la infección a su vez causa atrofia que puede generar metaplasia intestinal y estos cambios son factores precursores del cáncer gástrico (Dixon, 2001). El cáncer gástrico se

presenta aproximadamente en el 1 al 2% de la población infectada por *H. pylori* (Kusters *et al.*, 2006).

❖ **Linfoma de MALT.**

Una vez que la gastritis crónica activa progresa y hay una acumulación de tejido linfoide organizado en la mucosa, en algunos casos la patología evoluciona a linfoma de MALT (del inglés, Mucosa-Associated Lymphoid Tissue) que se caracteriza por una proliferación neoplásica monoclonal de linfocitos B que infiltran las glándulas gástricas, con típicas lesiones linfoepiteliales (Dixon, 2001). El diagnóstico se basa en la apariencia histológica en microscopia de rutina y en la demostración de clonalidad mediante inmunohistoquímica o técnicas moleculares tales como PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Casi todos los pacientes con linfoma de MALT son *H. pylori* positivos (Eidt *et al.*, 1994; Kusters *et al.*, 2006).

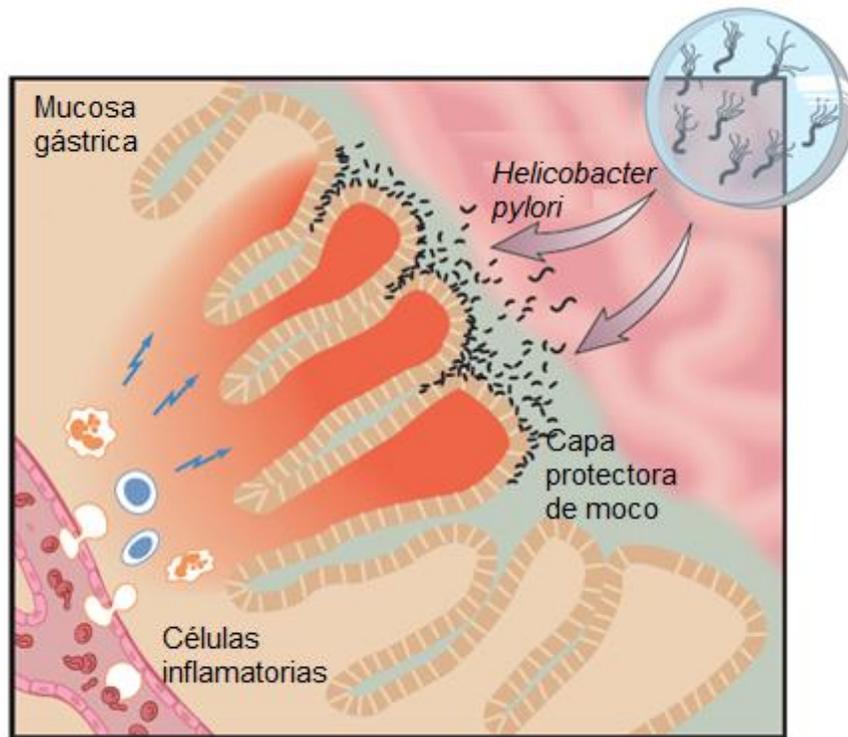
El riesgo de desarrollar alguna de las patologías anteriormente mencionadas depende principalmente de tres factores:

- a) Virulencia de la cepa bacteriana que infecta
- b) Susceptibilidad genética del hospedero
- c) Factores moduladores ambientales (hábitos dietéticos y fumar) (Atherton, 2006)

### **3.1.9 Histopatología**

La colonización de la mucosa gástrica por *H. pylori* induce una respuesta inflamatoria, predominante del tipo Th-1 (T-helper 1). La gastritis aguda inicial es seguida por la gastritis crónica activa, que dura de por vida si la infección no es tratada (Kuipers *et al.*, 1995). Sin embargo, la mayoría de los sujetos que son *H. pylori* positivos,

desconocen la inflamación debido a la falta de síntomas. Dicha respuesta inflamatoria se caracteriza por la migración de neutrófilos, células mononucleares y Th-1 (Figura 6), estas células pretenden disminuir la infección intracelular. Sin embargo, *H. pylori* no es un patógeno intracelular por lo que como resultado de la respuesta Th-1 se inicia un daño en las células epiteliales y no la eliminación de la bacteria. Por lo tanto, la continua presencia de *H. pylori* causa una respuesta proinflamatoria de por vida asociada al daño celular. La producción continua de especies reactivas de oxígeno (ROS) debido a la constante inflamación puede ocasionar cambios en el ADN de las células epiteliales, induciendo de éste modo múltiples mutaciones que se consideran necesarias para la iniciación de cáncer (Kusters *et al.*, 2006).



**Figura 6. Inflamación de la mucosa gástrica asociada a *H. pylori*.** Respuesta inflamatoria caracterizada por la migración de neutrófilos, células mononucleares y Th-1. Tomada y modificada de [www.abc.net.au/science/news/health/HealthRepublsh\\_1474064.htm](http://www.abc.net.au/science/news/health/HealthRepublsh_1474064.htm), 19 de Noviembre del 2011.

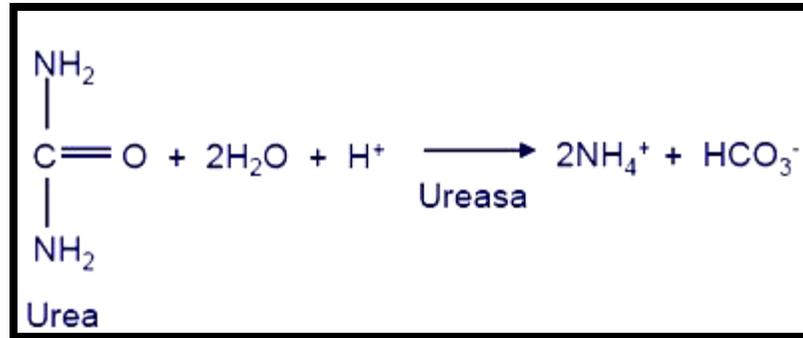
### 3.1.10 Diagnóstico de la Infección por *H. pylori*

Para diagnosticar la infección por *H. pylori* se utilizan diferentes métodos tanto directos como indirectos (Loy *et al.*, 1996; Vaira *et al.*, 1999). Los métodos directos se basan en la demostración directa de la bacteria mediante el estudio de muestras obtenidas por biopsias o secreciones gástricas y los métodos indirectos se basan en el estudio y detección de la respuesta inmune del hospedero en presencia de la infección o de ciertas características de la bacteria, siempre sin contar con una biopsia directa del tejido gástrico (De Argila y Boxeida, 2001).

#### **Métodos Directos:**

- ❖ **Histología.** Permite el estudio anatómico-patológico de la muestra gástrica, así como observar a la bacteria. Se utilizan varios tipos de tinciones para visualizar al organismo como la tinción de Gram, tinción de Giemsa y tinción de hematoxilina-eosina (Cervantes, 2006).
- ❖ **Cultivo.** Es un método diagnóstico con alta sensibilidad y especificidad, imprescindible en la investigación y el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos por *H. pylori*. No es una técnica de rutina ya que solo está indicada cuando hay resistencia del microorganismo al tratamiento (Cervantes, 2006).
- ❖ **Prueba rápida de la ureasa.** Es una prueba rápida que permite obtener el diagnóstico en un corto tiempo utilizando un indicador de pH. *H. pylori* hidroliza la urea por la producción de la ureasa, produciendo iones amonio, por lo que aumenta el pH de la solución produciendo un viraje del color del indicador. En la actualidad existen varias pruebas basadas en la reacción de la ureasa, siendo las más utilizadas el CLO-Test, el caldo de

Christensen y las soluciones de urea con concentraciones variables son de gran sensibilidad y especificidad (Cervantes, 2006).



**Figura 7. Reacción de la Ureasa**, sobre la cual se basa la prueba de detección rápida del mismo nombre. (Tomado y modificado de [www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/959/10/Helicobacter-pylori.-Prevalencia-y-asociacion-con-enfermedades-digestivas](http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/959/10/Helicobacter-pylori.-Prevalencia-y-asociacion-con-enfermedades-digestivas), 12 de Septiembre del 2012).

- ❖ **Pruebas moleculares.** La prueba de PCR, es de gran sensibilidad y especificidad muy elevadas, cercanas al 100%. Esta prueba por lo general se realiza en estudios de investigación (Cervantes, 2006). Se han desarrollado muchos protocolos para amplificar diferentes genes de *H. pylori* utilizando desoxiligonucleótidos específicos (Chisholm *et al.*, 2001; Oleastro *et al.*, 2003; Glocker y Kist, 2004). Al realizar la amplificación del gen *ureA* o *ureB* (genes que codifican para subunidades de la Ureasa), tanto de biopsias como de jugo gástrico, se puede detectar la presencia de *H. pylori*, así mismo, se pueden emplear biopsias embebidas en parafina (Chisholm *et al.*, 2001; Oleastro *et al.*, 2003; Glocker y Kist, 2004).

**Métodos Indirectos:**

- ❖ **Prueba del aliento con urea marcada ( $^{13}\text{C}$  o  $^{14}\text{C}$ ).** Es una prueba fácil de realizar, sin molestias y bien tolerada. Se basa en la capacidad de la ureasa de *H. pylori* para hidrolizar rápidamente una solución de urea marcada previamente, valorando la totalidad de la mucosa gástrica. Esta prueba detecta la infección activa con pequeñas cantidades del microorganismo. Consiste en que el paciente ingiera cápsulas, tabletas o una solución de urea marcada previamente con  $^{13}\text{C}$  o  $^{14}\text{C}$ , después de 15 a 30 minutos, se colecta el aire espirado en tubos de vidrio o plástico, que se sellan y en un espectrómetro se analiza la presencia de  $\text{CO}_2$  en el aliento (Dobois *et al.*, 1996; Mazari-Hiriart *et al.*, 2001). Por lo general se utiliza  $^{13}\text{C}$ . No se utiliza en niños ni en mujeres embarazadas (Cervantes, 2006).
- ❖ **Serología.** Es una prueba sencilla y barata basada en la detección de anticuerpos específicos contra los antígenos de *H. pylori*, debida a una reacción inmunológica del individuo. Esta técnica no hace diferencia entre las personas con infección activa y la enfermedad de pacientes infectados pero que son asintomáticos. Esta técnica es útil en estudios epidemiológicos o cuando no se puede realizar endoscopía (Cervantes, 2006).

**3.1.11 Tratamiento**

La finalidad de la erradicación de *H. pylori* es curar la enfermedad de la úlcera péptica y reducir el riesgo de cáncer gástrico (OMG, 2010). Al tratarse de una infección bacteriana, ésta debe ser tratada con antibióticos como cualquier otra y el tratamiento de primera elección es la terapia triple, que consiste en el empleo de dos antibióticos a los cuales *H. pylori* es susceptible (metronidazol, claritromicina, tetraciclina

y amoxicilina), así como la ingesta de un Inhibidor de la Bomba de Protones (IBP) que incrementa el pH estomacal o antagonistas de los receptores de histamina (Goodwin, 1997; Dehesa *et al.*, 1998; Mégraud, 2000). Dicha terapia dura de 7 a 14 días. Sin embargo ésta terapia falla en un 20% de los casos, ocasionada por la resistencia de la bacteria a los antibióticos. Debido a la problemática anterior, se recurre a la terapia cuádruple que consiste en la administración de dos antibióticos diferentes a los empleados en la terapia triple, junto con un IBP y sales de bismuto, éste tratamiento puede durar hasta 21 días (Wannmacher, 2011).

<b>Tabla 3. Medicamentos empleados en las terapias de erradicación de <i>H. pylori</i></b>	
<b>Antibióticos</b>	Amoxicilina Claritromicina Metronidazol Tetraciclina
<b>Antagonistas de los Receptores de Histamina</b>	Cimetidina Ranitidina Famotidina Nizatidina
<b>IBP</b>	Omeprazol Lanzoprazol Pantoprazol
<b>Protector de la Mucosa</b>	Subsalicilato de Bismuto

### 3.1.12 Resistencia Antibiótica en la Terapia anti-*H. pylori*

La resistencia antibiótica es un factor clave en el fracaso de la erradicación y la reincidencia de infección de la bacteria. Las tasas de resistencia a los antibióticos van en aumento a nivel mundial y varían de acuerdo a su posición geográfica, ya que en los países en desarrollo dicha problemática es alta y en países desarrollados va en aumento. Es por eso que los profesionales de la salud deben ser conscientes de la resistencia medicamentosa de su área antes de decidir sobre un régimen en particular (OMG, 2010). A continuación se describe el mecanismo de acción de los antibióticos utilizados en las terapias mencionadas anteriormente así como diversos problemas que se han reportado.

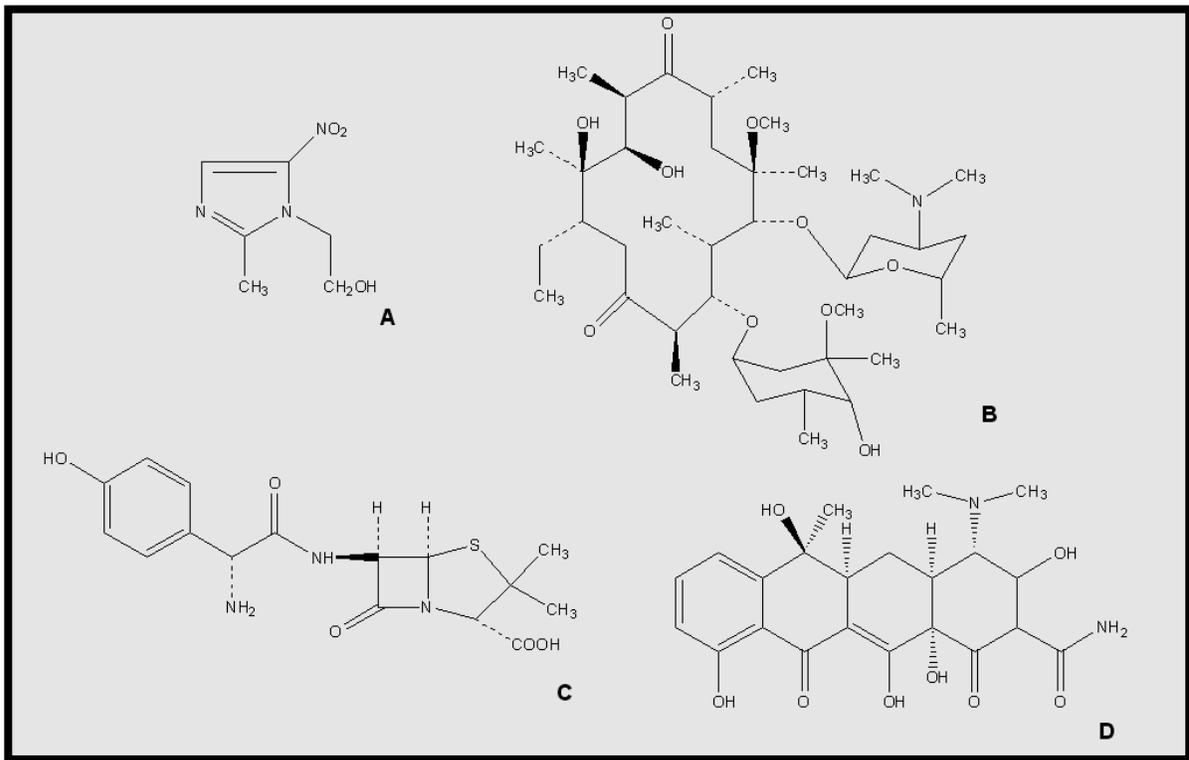
- ❖ **Metronidazol.** Es un antibiótico bactericida que pertenece al grupo de los nitroimidazoles. Se requiere de la reducción del grupo nitro de la estructura activa al metronidazol para formar un radical libre que oxida el ADN bacteriano y rompe la doble hélice provocando así la muerte celular de la bacteria. El principal mecanismo de resistencia de *H. pylori* al metronidazol se relaciona con la pérdida de la actividad de la enzima nitrorreductasa, necesaria para la funcionalidad del agente antimicrobiano (Vallejos *et al.*, 2007). Se ha encontrado una amplia variación de resistencia entre los países desarrollados y los países en vías de desarrollo. En Europa la resistencia oscila entre 6 y 40%, pero en África es cercana al 100%, lo anterior puede deberse al empleo indiscriminado del metronidazol para tratar algunas infecciones parasitarias y trastornos ginecológicos en poblaciones con una alta tasa de prevalencia (Gómez *et al.*, 2007).
- ❖ **Claritromicina.** Pertenece al grupo de los macrólidos, es un derivado semisintético de la eritromicina y el antibiótico de mayor potencia contra *H. pylori*. Se absorbe mejor en la mucosa gástrica,

es más estable a pH ácido y por lo tanto, es el más efectivo contra la bacteria (Megraud, 2004). Es un antibiótico bacteriostático que afecta la síntesis de proteínas uniéndose a la subunidad 23s del ARNr mediante la formación de puentes de hidrógeno entre diferentes radicales hidroxilo del antibiótico, interfiriendo así con la etapa de elongación en la síntesis de proteínas de la bacteria. La resistencia a la claritromicina por *H. pylori* es el resultado de mutaciones puntuales en el gen ARNr 23s (Versalovic *et al.*, 1996; Occhialini *et al.*, 1997), lo que provoca una modificación en la estructura del ribosoma alterando la unión al antibiótico y por lo tanto no se afecta la síntesis de proteínas (Occhialini *et al.*, 1997). En Europa y Estados Unidos existe una resistencia del 9 y 18%, respectivamente; sin embargo, los valores más preocupantes se encuentran en América Latina, específicamente en Perú con un 50% de resistencia y en el sureste asiático con un 29%, lo anterior debido al mayor consumo de éste antibiótico (Vásquez *et al.*, 1996; Kato *et al.*, 2002).

- ❖ **Amoxicilina.** Es un antibiótico  $\beta$ -lactámico derivado semisintético de la penicilina. Es bactericida y actúa internalizándose mediante las proteínas de unión a penicilina (PBPs, del inglés *penicilin binding proteins*) las cuales están localizadas en la superficie de la membrana bacteriana, una vez que entra, bloquea la síntesis de la pared por interferencia del anillo  $\beta$ -lactámico lo que propicia la lisis celular por desequilibrio osmótico (Ortíz *et al.*, 2006). El mecanismo de resistencia que la bacteria ha creado contra la amoxicilina consiste en mutaciones en las PBPs los que provoca una disminución en la afinidad de unión a la amoxicilina dando lugar a fenotipos resistentes (Gerrits *et al.*, 2006). La prevalencia de resistencia a este antibiótico es relativamente baja. En diversos

estudios se ha reportado una resistencia menor al 2%, con excepción de Kenya (4.6%) y Bangladesh (6.6%) (Vakil y Mégraud, 2007).

- ❖ **Tetraciclina.** Es otro de los antibióticos utilizado frecuentemente en la terapia erradicadora de *H. pylori*, sobretodo en el régimen de segunda línea (Chopra y Roberts, 2001). Es un antibiótico bacteriostático y su mecanismo de acción consiste en unirse a la subunidad ribosomal 30s, impidiendo la unión del ARN de transferencia aminoacil (ARNt-aa) a su sitio de unión (Schnappinger *et al.*, 1996; Brodersen *et al.*, 2000) y en consecuencia detiene la síntesis de proteínas. El mecanismo de resistencia de *H. pylori* a la tetraciclina se debe a la presencia de mutaciones en el gen 16s (Trieber y Taylor, 2002). Se estima una resistencia menor al 2%, excepto en Bulgaria con un 5.2% (Vakil y Mégraud, 2007).



**Figura 8. Antibióticos más utilizados para la erradicación de *H. pylori*.** (A) metronidazol; (B) claritromicina; (C) amoxicilina; (D) tetraciclina.

### 3.1.13 Problemática Actual de las Terapias anti-*H. pylori*

La administración de por lo menos tres fármacos en las terapias para la erradicación de *H. pylori*, en repetidas ocasiones al día y durante un largo periodo de tiempo, aunado a la aparición de efectos adversos como náuseas, vómitos, salpullido, dolor de cabeza, malestar estomacal y estomatitis (Ford *et al.*, 2006), provocan el abandono del tratamiento por parte del paciente. Lo anterior, sumado a los altos costos que implica solventar el tratamiento, así como la resistencia generada hacia los antibióticos utilizados en las terapias, conduce a la persistencia de la infección o en el peor de los casos a la evolución de la infección a padecimientos más severos como úlcera péptica y cáncer gástrico

(Palacios-Espinosa *et al.*, 2011). Por otra parte, aunque se haya logrado la erradicación de la bacteria con el tratamiento, es muy frecuente que los pacientes vivan en las mismas condiciones de higiene y se presente reincidencia de la infección.

Debido a lo anterior, surge la necesidad de buscar nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento de la infección y es en las plantas, en donde en esta Tesis, se centra el interés de encontrar nuevos agentes que puedan ser utilizados en el tratamiento de la infección por *H. pylori*.

### **3.2.1 Uso de Plantas Medicinales**

El uso de las plantas es tan antiguo como el hombre mismo. El hombre primitivo, empíricamente seleccionaba plantas que se utilizaban para extraer jugos, secar hojas y raíces, moler semillas útiles para su curación. La aparición del lenguaje le permitió transmitir los conocimientos adquiridos a sus descendientes e iniciar el marco teórico-práctico de conocimientos herbolarios que constituyeron la medicina del hombre en la antigüedad. Cuando el conocimiento fue sistematizado y se convirtió en un secreto compartido, entonces las modestas hierbas se transformaron en instrumento de poder, las cuales formaron parte de la medicina primitiva (Lozoya, 1994).

En México se estima que existen aproximadamente 30000 especies de plantas de las cuales, en 1997 el Instituto Nacional Indigenista (INI) documentó 3000 plantas con usos medicinales, esto es el 10% del total de la riqueza florística del país (Bye *et al.*, 1995). Sin embargo, se calcula que en México, y en todo el mundo, menos del 10% de plantas medicinales han sido estudiadas fitoquímicamente y menos del 5% han sido evaluadas farmacológicamente (Estrada *et al.*, 1995).

De acuerdo a la OMS en 1993, el 80% de la población mundial depende de la medicina tradicional que implica el uso de plantas, animales y/o minerales, terapias espirituales, técnicas manuales y ejercicios aplicados de forma individual o en combinación; por lo que el uso de las plantas medicinales sigue desempeñando un papel importante en los países en desarrollo para cubrir las necesidades básicas de salud de la población (Namita y Mukesh, 2012).

### **3.2.2 Plantas medicinales: Una alternativa contra *H. pylori***

En los últimos años, la resistencia de bacterias patógenas humanas a antibióticos se ha identificado en todo el mundo (Pidcock y Wise, 1989; Singh *et al.*, 1992; Mulligen *et al.*, 1993). Debido al uso descontrolado de antibióticos, los microorganismos han desarrollado resistencia, además, su uso se relaciona con la aparición de efectos adversos como hipersensibilidad, disminución de la microbiota intestinal, irritabilidad de la mucosa, inmunosupresión y reacciones alérgicas (Lopez *et al.*, 2001). Lo anterior ha creado un gran problema en el tratamiento de enfermedades infecciosas y en el caso de *H. pylori*, ésta no es la excepción.

De acuerdo al conocimiento actual, se ha propuesto que las plantas o sus productos derivados, pueden estar interviniendo en la resolución de las patologías asociadas a *H. pylori* con los siguientes efectos (Castillo-Juárez y Romero, 2007):

- ❖ **Preventivo.** Plantas que se consumen frecuentemente como parte de la dieta (frutos y especias) para prevenir la infección.
- ❖ **Atenuante.** Extractos o mezclas herbales que disminuyen el número de bacterias o retrasan su crecimiento.

- ❖ **Protector.** Extractos o compuestos capaces de disminuir la inflamación y el daño a la mucosa gástrica.
- ❖ **Eliminador.** Aun no se conoce alguna planta o producto de ella que tenga el efecto de eliminar la bacteria *in vivo*, sólo *in vitro*, sin embargo, estos productos pueden incluirse en la terapia ya sea en combinación con otros productos naturales ó antibióticos comerciales para lograr dicho efecto.

### 3.3.1 Antecedentes Directos

En el laboratorio donde se realizó el presente trabajo de Tesis se ha estado trabajando por varios años en el estudio de la actividad anti-*H. pylori* de plantas medicinales mexicanas. En el 2009, se realizó una evaluación de la actividad anti-*H. pylori* de 53 extractos de plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana para trastornos gastrointestinales, encontrando que el 77% mostró alguna actividad contra la bacteria (Castillo-Juárez *et al.*, 2009). Una de estas plantas fue *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana*, cuyo extracto acuoso presentó una de las mejores actividades contra la bacteria, con una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 125 µg/mL, al compararla con el antibiótico de referencia metronidazol, con una CMI de 300 µg/mL, por lo que se decidió profundizar en su estudio.

Posteriormente, Cortés (2012) en su trabajo de tesis evaluó la toxicidad del extracto acuoso de *A. ludoviciana* (ALI), obteniendo una  $DL_{50} > 5g/kg$ , que de acuerdo al método utilizado de Lorke se considera como no tóxico. También se evaluó la actividad gastroprotectora de ALI obteniendo una  $DE_{50}$  de 77.13 mg/kg, considerándose dicho extracto con una actividad gastroprotectora moderada, al compararla con otros el extractos acuosos (Escobedo-Hinojosa *et al.*, 2012).

Dado que el extracto había presentado buena actividad contra *H. pylori*, Cortés realizó un fraccionamiento primario del extracto acuoso (ALI) mediante particiones sucesivas liquido-líquido con disolventes orgánicos de polaridad creciente; la fracción resultante de la partición con diclorometano (DM) se denominó **ALI-1**, la fracción resultante de la partición con acetato de etilo (AE) se denominó **ALI-2**, la fracción resultante de la partición con butanol (BUT) se denominó **ALI-3** y su correspondiente fase acuosa se denominó **ALI-4**. Posteriormente, determinó la actividad anti-*H. pylori* de ALI y sus fracciones primarias, donde se concluyó que tanto la fracción de diclorometano (ALI-1) como la fracción de acetato de etilo (ALI-2) poseían buenas actividades contra la bacteria con una CMI de 62.5 y 125 µg/mL, respectivamente. En este mismo trabajo, se realizó el fraccionamiento biodirigido de ALI-1 y se aisló a la estafiatina como parte de sus productos bioactivos, obteniendo una CMI de 7.81 µg/mL.

### **3.4.1 *Artemisia ludoviciana*. Generalidades y Taxonomía**

*A. ludoviciana* es cultivada en huertos familiares, crece a orillas de caminos, en terrenos de cultivo abandonados y es común en vegetación perturbada de bosques tropicales, bosques espinosos, matorrales xerófilos, bosques mesófilos de montaña, bosques de encino, de pino, de pino-encino y de junípero (Argueta, 1994). La subespecie presente en el Valle de México es *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana* (Willd) (Consultado el 21 de Noviembre del 2012 en [www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/artemisia-ludoviciana/fichas/ficha.htm](http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/artemisia-ludoviciana/fichas/ficha.htm)). De acuerdo con la base de datos del Herbario del Jardín Botánico de Missouri (Missouri Botanical Garden [www.tropicos.org/Name/2700146](http://www.tropicos.org/Name/2700146)), *A. ludoviciana* está clasificada de la

siguiente manera:

<b>Tabla 4. Clasificación de <i>A. ludoviciana</i>.</b>	
<b>Reino</b>	Plantae
<b>Phylum</b>	Equisetophyta
<b>Clase</b>	Equisetopsida
<b>Subclase</b>	Magnoliidae
<b>Orden</b>	Asterales
<b>Familia</b>	Asteraceae
<b>Género</b>	Artemisia
<b>Nombre científico</b>	<i>Artemisia ludoviciana</i> subsp. <i>mexicana</i> (Wild. Ex Spreng.) D. D. Keck

### 3.4.2 Nombres Comunes

*A. ludoviciana* se conoce comúnmente como ajenjo, ajenjo del país, altamiza, altaniza, artemisia, azúmate de Puebla, cola de zorrillo, ensencio de mata verde, epazote de castilla, estomiate, hierba maestra, hierba maistra, incienso, incienso verde, estafiate e istafiate.

Su nombre también varía de acuerdo al estado de la República Mexicana en donde se encuentre ya que en el Estado de México se conoce como *ambfe* o *istafiatl*; en Hidalgo, Puebla y Michoacán como *iztauhyatl*; en Quintana Roo como *osomiate*; en Veracruz como *xun*; en San Luis Potosi como *tenek* y en Chihuahua como *rarámuri* (Argueta, 1994).

### 3.4.3 Sinonimia científica

De acuerdo al Missouri Botanical Garden, *A. ludoviciana* subsp. *mexicana* (Willd. ex Spreng.) D.D. Keck presenta diversas sinonimias:

- ❖ *Artemisia indica* var. *mexicana* (Willd. ex Spreng.) Besser
- ❖ *Artemisia ludoviciana* var. *mexicana* (Willd. ex Spreng.) Fernald
- ❖ *Artemisia vulgaris* subsp. *mexicana* (Willd. ex Spreng.) H.M. Hall & Clem.
- ❖ *Artemisia vulgaris* var. *mexicana* (Willd. ex Spreng.) Torr. & A. Gray
- ❖ *Oligosporus mexicanus* (Willd. ex Spreng.) Less.

### 3.4.4 Descripción

El estafiate es una hierba erguida de hasta 1 m de altura, sus flores son amarillentas y sus hojas son grisáceas o blanquecinas, están divididas en tres, con forma de listones alargados. Por el envés son peludas y blanquecinas y verdes por arriba. (Consultado en [www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Artemisia%20ludoviciana&id=7823](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Artemisia%20ludoviciana&id=7823), 01 de Agosto del 2012).



**Figura 9: *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana* (Willd. ex Spreng.) D.D. Keck.** Ejemplar de referencia de la colección etnobotánica del Herbario Nacional (MEXU) del Jardín Botánico.

### 3.4.5 Distribución

*A. ludoviciana* es una planta originaria de Estados Unidos, México y Guatemala. Habita en climas cálido, semicálido, semiseco y templado, desde el nivel del mar a los 700 m y de los 1600 a los 3900 m.

(Consultado en [www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Artemisia%20ludoviciana&id=7823](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Artemisia%20ludoviciana&id=7823), 01 de Agosto del 2012).



**Figura 10. Distribución de *A. ludoviciana*.** Los símbolos verdes corresponden a los sitios de registro de la especie (Tomado y modificado de [www.tropicos.org](http://www.tropicos.org), 01 de Agosto del 2012).

En México, se encuentra en estados como Aguascalientes, Baja California Norte, Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Distrito Federal, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas.

### **3.4.6 Uso Etnomédico**

A nivel nacional, el estafiate es recomendado para el tratamiento de dolores de estómago como retortijones, cólicos, dolor e inflamación de la boca del estómago, en caso de corajes fuertes, como aperitivo, contra el vómito, en caso de infecciones gastrointestinales, problemas menstruales, disentería, como abortivo, entre otros. Se consume también en combinación con otras plantas para el caso de diarreas y cuando se sospecha de la presencia de parásitos intestinales. Las partes aéreas del estafiate se consumen generalmente como infusión en el caso de diarreas o en presencia de parásitos intestinales; en casos de falta de apetito, sustos, palidez o excremento verde éste se administra como supositorio; en caso de reumatismo, frialdad, dolor o inflamación se utiliza preparada con alcohol para ingerirla o frotarla en el cuerpo y en caso de padecimientos respiratorios como anginas, bronquitis, catarros, resfríos, tos, tosferina y otros el estafiate se utiliza en forma de gárgaras, frotado, inhalado o por vía oral. (Argueta *et al.*, 1994).

### **3.5.1 Información Fitoquímica**

De acuerdo a lo reportado en la literatura, las especies del género *Artemisia*, han sido estudiadas por poseer una importante cantidad de fitoconstituyentes, entre los que se encuentran flavonoides, terpenoides, cumarinas, esteroides, acetilenos y ácidos cafeoilquínicos (Kundan y Anupam, 2011). En el caso de *A. ludoviciana* subsp. *mexicana*, se han identificado diversos metabolitos, de los cuales se presentan a continuación:

**Tabla 5. Metabolitos identificados en el estafiate.**

<b>Flavonoides</b>	<b>Referencia</b>
Eupatilina	Ruiz-Cancino <i>et al.</i> , 1993; Balderas, 2006
Jaceosidina	Ruiz-Cancino <i>et al.</i> , 1993
5-hidroxi-3',4',6,6-tetrametoxiflavona	Balderas, 2006
<b>Lactonas Sesquiterpénicas</b>	<b>Referencia</b>
Arglanina	Ruiz-Cancino <i>et al.</i> , 1993; Balderas, 2006
Douglanina	Lee y Geissman, 1970; Ruiz-Cancino <i>et al.</i> , 1993
Santamarina	Ruiz-Cancino <i>et al.</i> , 1993
Armexifolina	Balderas, 2006
Ludovicina	Lee y Geissman, 1970
Armefolina	Ruiz-Cancino <i>et al.</i> , 1993; Balderas, 2006
Ludovicina A	Ruiz-Cancino <i>et al.</i> , 1993; Balderas, 2006
Ludovicina B	Lee y Geissman, 1970
Santonina	Lee y Geissman, 1970
Yomogina	Lee y Geissman, 1970
$\alpha$ -epoxiludalbina	Mata <i>et al.</i> , 1984
Ridentina	Ruiz-Cancino <i>et al.</i> , 1993; Balderas, 2006
Estafiatina	Balderas, 2006; Cortés, 2012
Crisartemina B	Ruiz-Cancino <i>et al.</i> , 1993
Artemorina	Ruiz-Cancino <i>et al.</i> , 1993
Tulipinolida	Mata <i>et al.</i> , 1984

### 3.5.2 Estudios previos de actividades biológicas de *A. ludoviciana*

Las especies del género *Artemisia*, han sido estudiadas por poseer propiedades biológicas y farmacológicas, dentro de las que se encuentran actividades antimaláricas, antihepatotóxicas, antibacteriales, antifúngicas y antioxidantes (Kundan y Anupam, 2011). De acuerdo a la literatura, se han encontrado diversas propiedades de *A. ludoviciana*, las cuales se resumen a continuación:

**Tabla 6. Estudios previos de *A. ludoviciana*.**

<b>Actividad Farmacológica</b>	<b>Referencia</b>
Efecto eupéptico de la tintura de la planta.	Castanedo, 1906.
Actividad antidiarreica de la planta debido al nonanal del aceite esencial.	Zavala-Sánchez <i>et al.</i> , 2002.
Efecto antiespasmódico, favorece la excreción de jugos gástricos y se emplea para controlar dolores tipo cólico en caso de litiasis biliar.	Rojas-Alba, 2009.
Efecto antiinflamatorio del extracto etanólico.	Bork <i>et al.</i> , 1996, 1997.
<b>Actividad Antimicrobiana</b>	<b>Referencia</b>
Efecto antihelmíntico administrando la planta en forma de cápsulas, como aceite esencial o polvo de flores en pacientes con signos y síntomas de parásitos.	Terres, 1897; Castanedo, 1906.
Actividad antibacteriana del extracto metanólico contra <i>Candida albicans</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Navarro <i>et al.</i> , 1996.

Efecto inhibitorio del crecimiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (agente causal de la tuberculosis) de los extractos hexánico y metanólico.	Arellanes <i>et al.</i> , 2003.
Actividad antibacteriana del extracto metanólico contra <i>Escherichia coli</i> y <i>Shigella flexneri-2</i> .	Alanís <i>et al.</i> , 2005; Dubal <i>et al.</i> , 2009.
Efecto antiprotozoario del extracto etanólico contra <i>Plasmodium yoelii</i> , así como del extracto acuoso, metanólico, hexánico y acetónico contra <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Giardia lamblia</i> .	Fernández <i>et al.</i> , 2005; Calzada <i>et al.</i> , 2006.
Efecto inhibitorio del crecimiento y producción de enterotoxinas de <i>Vibrio cholerae</i> del extracto etanólico.	García <i>et al.</i> , 2006.
Actividad anti- <i>H. pylori</i> del extracto acuoso y extracto metanólico.	Castillo-Juárez <i>et al.</i> , 2009
<b>Otras Actividades</b>	<b>Referencia</b>
Efecto de los polvos contra el desarrollo del gorgojo del maíz.	Juárez-Flores <i>et al.</i> , 2010.

## **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS**

### **4.1.1 JUSTIFICACIÓN**

*H. pylori* infecta alrededor de la mitad de la población mundial, más del 70% de la población infectada aparenta ser asintomática, sin embargo, a partir de la colonización del estómago humano se pueden desarrollar patologías como gastritis, úlcera péptica, cáncer gástrico o linfoma de MALT (McColl, 1992; Das y Paul, 2007).

Existen ciertos factores de riesgo que propician el aumento en la prevalencia de la infección en los países en desarrollo, estos incluyen bajo desarrollo socio-económico (Lehours y Yilmaz, 2007; Pérez-Pérez *et al.*, 2004), bajo nivel educativo, escasas prácticas de higiene durante la infancia, condiciones de hacinamiento en las familias, falta de baño en casa, ausencia de agua potable, falta de un sistema de eliminación de aguas residuales (Nouraie *et al.*, 2009) y manipulación inadecuada de los alimentos (Van Duynhoven y de Jonge, 2001).

Una vez adquirida la infección suele ser permanente si no es tratada (Vale y Vítor, 2010), es por ello que se recurre a la administración conjunta de antibióticos y otros medicamentos en la terapia contra *H. pylori*. Sin embargo, la frecuente administración de antibióticos y la falta de cumplimiento del tratamiento debido a los efectos secundarios que provocan, conducen a la aparición de resistencia a los mismos por parte de la bacteria y a la evolución de padecimientos mas graves. En vista de la existencia de dicho problema surge la necesidad de encontrar nuevos principios activos que sean efectivos en la infección de *H. pylori* y es en los productos naturales, específicamente en las plantas, donde se vislumbra una fuente importante para la obtención de dichos agentes terapéuticos.

En el 2009, Castillo-Juárez y colaboradores realizaron una evaluación de la actividad anti-*H. pylori* de extractos acuosos y metanólicos de 53 plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana para trastornos gastrointestinales. Una de estas plantas fue *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana*, la cual presentó una de las mejores actividades contra la bacteria, por lo que se decidió profundizar en su estudio.

En este sentido, Cortés (2012) en su trabajo de tesis, evaluó la actividad anti-*H. pylori* de un extracto acuoso (ALI) y las fracciones primarias derivadas del estudio fitoquímico biodirigido. Algunas de sus conclusiones fueron que, tanto ALI-1 (fracción extraída con DM) como ALI-2 (fracción extraída con AE) poseían buenas actividades contra la bacteria. En ese mismo trabajo, del fraccionamiento biodirigido de ALI-1 se aisló a la estafiatina como parte de sus productos bioactivos. Así mismo, demostró que ALI no era tóxico y que poseía una buena actividad gastroprotectora.

Debido al potencial que ha mostrado ALI como fuente de compuestos anti-*H. pylori*, en el presente trabajo de Tesis, se decidió continuar con el estudio de las actividades gastroprotectoras y antiinflamatorias de ALI y sus fracciones primarias, así como el fraccionamiento biodirigido de ALI-2 para aislar los compuestos responsables de la actividad antibacteriana.

#### 4.1.2 Objetivos Generales y Particulares:

1. Estudiar las actividades gastroprotectora y antiinflamatoria del extracto acuoso de *A. ludoviciana* (ALI) y sus fracciones primarias.
  - ❖ Evaluar mediante el modelo de úlcera aguda inducida por etanol absoluto en ratón el potencial gastroprotector de ALI y sus fracciones primarias.
  - ❖ Evaluar mediante el modelo de edema agudo en oreja de ratón inducido con xilol o acetato de tetradecanoil-forbol (TPA), el efecto antiinflamatorio de ALI y sus fracciones primarias.
  
2. Realizar el fraccionamiento biodirigido de la fracción ALI-2.
  - ❖ Realizar el fraccionamiento biodirigido por la actividad anti *H. pylori* y gastroprotectora de ALI-2, utilizando el método de dilución en cultivo líquido para determinar las CMI y el modelo de úlcera inducida con etanol absoluto en ratones para determinar el porcentaje de gastroprotección.
  - ❖ Establecer la identidad de los productos activos utilizando técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
  - ❖ Obtener la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los productos activos obtenidos.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1.1 Material Vegetal

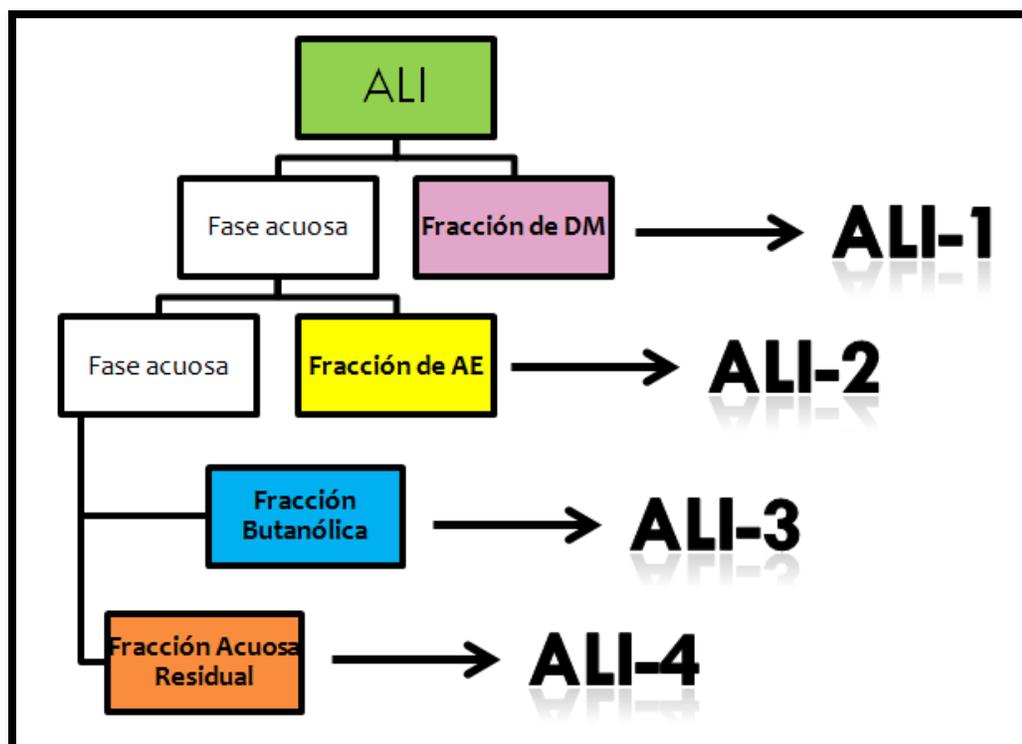
En esta investigación se utilizaron las partes aéreas frescas de la planta *A. ludoviciana* subsp. *mexicana* (Willd. Ex Spreng) D.D. Keck, las cuales se obtuvieron en el Mercado de Sonora en el Distrito Federal, Delegación Venustiano Carranza. El material antes mencionado fue secado y molido.

La clasificación botánica de dicha planta la realizó la Dra. Edelmira Linares y el Dr. Robert Bye Boettler, del Instituto de Biología de la UNAM. Se depositó un ejemplar de referencia en la colección etnobotánica del Herbario Nacional (MEXU) del Jardín Botánico del mismo Instituto con número de registro 12599898.

### 5.1.2 Preparación y Fraccionamiento Primario de ALI

En este trabajo se utilizó el extracto acuoso obtenido por infusión y las fracciones primarias de *A. ludoviciana* preparadas previamente por Cortés (2012). A continuación se describe brevemente su preparación: Se colocaron 10 g de material vegetal seco y molido en un matraz Erlenmeyer de 500 mL con 250 mL de agua hirviendo, dicha mezcla se dejó reposar durante 30 min y posteriormente se filtró por gravedad para obtener el extracto sin residuos de material vegetal denominado **ALI**. Posteriormente, al extracto se le realizaron particiones sucesivas líquido-líquido con disolventes orgánicos de polaridad creciente, tal como se muestra en la Figura 11; la fracción resultante de la partición con diclorometano (DM) se denominó **ALI-1**, la fracción resultante de la partición con acetato de etilo (AE) se denominó **ALI-2**, la fracción resultante de la partición con butanol (BUT) se denominó **ALI-3** y su

correspondiente fase acuosa se denominó **ALI-4**. Las fracciones obtenidas se concentraron en un rotaevaporador hasta llegar a sequedad.



**Figura 11. Fraccionamiento del extracto acuoso de *A. ludoviciana* (ALI) y sus correspondientes fracciones primarias obtenidas mediante particiones líquido-líquido (DM= diclorometano, AE= acetato de etilo).**

## **5.2 FRACCIONAMIENTO, AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA FLAVONA EUPATILINA**

### **5.2.1 Fraccionamiento secundario y terciario de ALI 2**

El fraccionamiento secundario de ALI 2 se llevó a cabo por cromatografía en columna abierta (CCA), en una columna de vidrio empacada con 150 g de gel de sílice Merck 60, gránulo de 0.2-0.5 mm, malla 3.5 a 7.0

ASTM y utilizando 1.4 g de ALI-2. La columna fue eluída con diferentes mezclas de disolventes de polaridad creciente, comenzando con hexano-acetato de etilo [(1:1) → (0:1)] hasta metanol (100%). Al final se obtuvieron 208 fracciones las cuales se reunieron en 6 grupos nombrados **A, B, C, D, E** y **F**.

El fraccionamiento terciario de la fracción **C**, se realizó por CCA, en una columna de vidrio empacada con Sephadex LH-20 como fase estacionaria (cama de esferas de tamaño de 25-100  $\mu\text{m}$ ), con un punto de aplicación de 181.4 mg y metanol como disolvente para la fase móvil. Al final se obtuvieron 10 fracciones las cuales se reunieron en 5 grupos nombrados **C.1, C.2, C.3, C.4** y **C.5**.

La fracción C.4 al llegar a sequedad lució como un sólido de color amarillo el cual se logró identificar como **eupatilina**. Para su identificación se envió una muestra al Instituto de Química y en un equipo Varian Inova 300 utilizando  $\text{CDCl}_3$  como disolvente y TMS como referencia interna se obtuvieron los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMN- $^1\text{H}$ ) y de carbono (RMN- $^{13}\text{C}$ ).

## **5.3 ENSAYOS BIOLÓGICOS *IN VIVO***

### **5.3.1 Animales de Experimentación**

Se utilizaron ratones machos de la cepa CD-1 con pesos de 20-25 g para la evaluación de la actividad antiinflamatoria y de 40-45 g para los ensayos de evaluación de actividad gastroprotectora. Los ratones se adquirieron del Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM y fueron alojados bajo condiciones estándar de laboratorio provistos de alimento y agua *ad libitum*, y se mantuvieron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999), la cual establece las especificaciones

técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

### 5.3.2 Evaluación de la Actividad Gastroprotectora

Para determinar la actividad gastroprotectora de ALI y sus fracciones primarias se indujeron úlceras de acuerdo al método descrito por Bucciarelli y Skliar en el 2007, donde se utiliza etanol absoluto como agente injuriante. Los ratones se distribuyeron en grupos de 6 individuos, se utilizó un grupo control negativo al cual se le administró solución de NaCl al 0.9% (SSI), otro grupo al cual se le administró el producto de referencia carbenoxolona como control positivo (CAR, 50 y 100 mg/kg) y los grupos experimentales donde se ensayaron las muestras de estudio (100 mg/kg). Todos los tratamientos se administraron por vía oral (*p.o.*) a razón de 7 mL/kg y una hora después se administró el etanol absoluto, *p.o.* (7 mL/kg). El agente injuriante actúa durante una hora y media; posteriormente se sacrifican los animales en una cámara de CO<sub>2</sub>. Enseguida, se obtuvieron los estómagos, fueron llenados con formaldehído al 2% y se colocaron durante 30 min en un recipiente que contenía la misma solución. Cada estómago fue abierto a lo largo de la curvatura mayor y colocado entre dos placas de vidrio para después escanearlo y medir el área de ulceración con el software **ImageJ**<sup>®</sup>. De acuerdo a los datos obtenidos se calcula el porcentaje de inhibición de úlcera (%I) con la siguiente fórmula:

$$\%I = \left( \frac{IU_{Promedio\ del\ Grupo\ Control} - IU_{Promedio\ del\ Grupo\ Tratado}}{IU_{Promedio\ del\ Grupo\ Control}} \right) \times 100$$

### 5.3.3 Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria

Se evaluó la actividad antiinflamatoria de ALI y sus fracciones primarias de acuerdo a la metodología descrita por De Young y colaboradores (1989) con algunas modificaciones.

#### 5.3.3.1 Administración de los Tratamientos mediante la Vía Tópica

Los ratones fueron anestesiados con pentobarbital (60 mg/kg, *i.p.*) y distribuidos en grupos de al menos 6 individuos cada uno, se utilizó un grupo control al cual se le administró el vehículo (acetona al 70%) como control negativo, un grupo al que se le administró el fármaco de referencia indometacina (como 0.5 mg/oreja, control positivo) y los grupos experimentales a los que se les administró ALI (0.25-0.5 mg/oreja) ó sus fracciones primarias ALI-1, ALI-2, ALI-3 o ALI-4 (0.5 mg/oreja).

En la oreja derecha se administró tópicamente el tratamiento: ALI, fracciones primarias o indometacina (0.5 mg/oreja) e inmediatamente después, la solución irritante: TPA (10  $\mu$ L/oreja) ó xilol (30  $\mu$ L/oreja). A la oreja izquierda se le administró el vehículo apropiado y sirvió como control negativo. Posteriormente, (para el TPA, después de 4 h y para el xilol, después de 1 h) se sacrifican los animales en una cámara de CO<sub>2</sub> y se obtienen muestras de oreja de 7 mm de diámetro con un sacabocados para pesarlas y calcular el %Inhibición del Edema (%IE) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\%IE = \frac{\Delta P_c - \Delta P_p}{\Delta P_c} \times 100$$

Donde:  $\Delta P_c$ = media aritmética del incremento de peso de las orejas en el grupo control

$\Delta P_p$  = media aritmética del incremento de peso de las orejas en el grupo problema.

Se determina la desviación estándar (DE) y el error estándar de la media (EEM) de cada una de las medias obtenidas, así como la significación estadística de las diferencias, usando el test de la *t* de Dunnett (\**P* < 0,05; \*\* *P* < 0,01).

### **5.3.3.2 Administración de los Tratamientos mediante la Vía Oral**

Los ratones fueron distribuidos en grupos de al menos 6 individuos cada uno, se utilizó un grupo como control negativo al cual se le administró SSI (*p.o.*), un grupo al que se le administró el fármaco de referencia indometacina (30 mg/kg, *p.o.*) control positivo y, los grupos experimentales a los que se les administró ALI (30 y 100 mg/kg, *p.o.*) ó sus fracciones primarias ALI-1, ALI-2, ALI-3 y ALI-4 (30 y 100 mg/kg, *p.o.*). Todos los tratamientos anteriormente mencionados se administraron a razón de 7 mL/kg. Después, los ratones fueron anestesiados con pentobarbital (60 mg/kg, *i.p.*) y 30 min después de la administración de los tratamientos, el edema fue inducido mediante la aplicación de TPA (10  $\mu$ L/oreja) ó xilol (30  $\mu$ L/oreja) en la superficie de la oreja izquierda. La oreja fue considerada como control. Posteriormente, (para el TPA, después de 4 h y para el xilol, después de 1 h) se sacrificaron a los animales en una cámara de CO<sub>2</sub> y se obtuvieron muestras de oreja de 7 mm de diámetro con un sacabocados para pesarlas y calcular el % Inhibición del Edema (%IE) como se explicó en la sección anterior.

## **5.4 ENSAYOS BIOLÓGICOS *IN VITRO***

Se utilizó la cepa de colección de *H. pylori* ATCC43504.

### **5.4.1 Cultivo de *H. pylori***

Se sembró la bacteria *H. pylori* ATCC 43504 en placas de cultivo de agar sangre y se incubaron durante uno o dos días en condiciones microaerofílicas (10% CO<sub>2</sub> y 5% O<sub>2</sub>) en una incubadora Nuair TS autoflow, modelo 3500. Terminado este periodo se observa un tapete traslúcido en la superficie de la placa, el cual es colectado en 500 µL de medio de cosecha y se conservan, hasta su uso, a -70°C en un ultracongelador Revco (para detalles de los medios utilizados ver Anexo I). Rutinariamente la bacteria fue identificada mediante pruebas bioquímicas descritas en el Anexo II.

### **5.4.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

La CMI es la concentración más baja que provoca un 100% de inhibición del crecimiento bacteriano y representa la actividad antibacteriana de las muestras evaluadas. Las actividades anti-*H. pylori* de las fracciones y el compuesto obtenido fueron evaluadas mediante el método de dilución en cultivo líquido basándonos en las recomendaciones del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), en el medio de cultivo líquido Müeller-Hinton y bajo condiciones microaerofílicas de incubación, con una agitación suave de 150 rpm a 37°C. Las muestras se diluyeron en DMSO y se adicionaron 10 µL de dichas diluciones a 1.5 mL de un cultivo bacteriano, el cual se encontraba al inicio de la fase logarítmica de crecimiento ( $\sim 10^8$  UFC/mL), con el objetivo de obtener concentraciones finales de las

muestras de 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81 µg/mL. En este momento se extrajeron 650 µL de cultivo bacteriano y se le midió la absorbencia inicial mediante un espectrofotómetro ( $A_i$ ). Terminadas las 24 hrs. de incubación se obtuvo otra muestra de igual volumen ( $A_f$ ) para calcular, mediante la diferencia de absorbencias, el porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano con respecto al control (al cual solo se le añadió 10 µL DMSO), tal como se muestra a continuación:

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

Donde:  $A_f$ =Absorbencia final del cultivo

$A_i$ =Absorbencia inicial del cultivo

Posteriormente se obtiene el crecimiento bacteriano (%C), utilizando el valor promedio de los controles negativos ( $\Delta A_c$ ) y de los experimentales ( $\Delta A_e$ ), mediante la siguiente fórmula:

$$\% C = \frac{\Delta A_e \times 100}{\Delta A_c}$$

El porcentaje de inhibición del crecimiento se calcula con la expresión:

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

%C=Porcentaje Crecimiento Bacteriano

Al observar los %I, se determina la CMI de las fracciones ensayadas y el compuesto aislado. Cabe destacar que todos los experimentos fueron realizados por triplicado y se repitieron como mínimo 3 veces. El DMSO, a la concentración añadida no tiene ningún efecto sobre el crecimiento de la bacteria.

### **5.4.3 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)**

La CMB es la mínima concentración de un agente antimicrobiano que elimina a más del 99.9% de los microorganismos viables, después de un tiempo determinado de incubación. La determinación de éste parámetro nos permite saber si el efecto antimicrobiano del compuesto aislado, mata a la bacteria o inhibe temporalmente su crecimiento, es decir si es un antimicrobiano bactericida o bacteriostático.

Para determinar el efecto antimicrobiano de la eupatilina se prepararon diluciones de eupatilina en DMSO (dimetilsulfóxido) para obtener concentraciones finales de 120, 60, 30 y 15 µg/mL.

Se utilizó un cultivo bacteriano al inicio de la fase logarítmica de crecimiento ( $\sim 10^8$  UFC/mL) crecido de acuerdo a las recomendaciones del CLSI e incubado bajo las condiciones microaerófilas previamente descritas. A partir de éste, se distribuyeron 15 mL en 6 matraces Erlenmeyer de 50 ml. Uno de los matraces se utilizó como control negativo (con 100 µL de DMSO), otro como control positivo (con 100 µL de metronidazol 300 µg/mL) y a los cuatro matraces restantes se les adicionó 100 µL de cada una de las diferentes diluciones preparadas de eupatilina. Se tomaron muestras de absorbencia inicial y a partir este momento y cada 2 horas se midió la absorbencia. También se realizaron diluciones seriadas a partir del cultivo para sembrarlas en placas de cuentas viables para la posterior determinación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

Las placas de cuentas viables obtenidas se incubaron bajo las condiciones microaerófilas anteriormente mencionadas (Véase sección 5.4.1) durante 7 días, al término de los cuales se contaron las colonias

de *H. pylori* para establecer el número de UFC que había en cada condición experimental.

El cálculo del número de UFC se realiza con la siguiente fórmula:

$$\frac{UFC}{mL} = \bar{X}_{colonias\ contadas} \times \frac{1}{dilución} \times \frac{1}{Vol. sembrado (mL)}$$

Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desde tiempos ancestrales *A. ludoviciana* subsp. *mexicana* ha sido una especie medicinal de amplio uso en nuestro país, principalmente en el tratamiento de diversos padecimientos del tracto gastrointestinal como dolores, diarrea, infecciones, gastritis, entre otros (Argueta, 1994).

Investigaciones recientes realizadas en nuestro grupo de trabajo por Castillo-Juárez y colaboradores (2009) demostraron que ALI representa una fuente potencial para la obtención de compuestos activos anti-*H. pylori*. De igual forma, en el trabajo de tesis de Cortés (2012) se estudió un extracto acuoso de esta especie demostrando su baja o nula toxicidad, su potencial gastroprotector y su actividad antibacteriana. Así mismo, se identificaron a las fracciones primarias de diclorometano (ALI-1) y de acetato de etilo (ALI-2) como las de mejor actividad anti-*H. pylori* y logró el aislamiento de la lactona sesquiterpénica estafiatina a partir de ALI-1 con una CMI= 15.6 µg/ml mediante un proceso biodirigido. Es por eso que, con base en los antecedentes antes mencionados, este trabajo continúa la investigación farmacológica y química tanto del extracto acuoso íntegro como de sus fracciones primarias.

De acuerdo a los dos objetivos generales, dividiremos los resultados en dos partes, la primera corresponde al estudio farmacológico de ALI y sus fracciones primarias (Objetivo 1) y la segunda, referente al fraccionamiento biodirigido de la fracción primaria ALI-2 (Objetivo 2).

## **6.1 1ª PARTE: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD GASTROPROTECTORA Y ANTIINFLAMATORIA DE ALI Y SUS FRACCIONES PRIMARIAS**

### **6.1.1 Evaluación de la Actividad Gastroprotectora de las Fracciones Primarias de ALI**

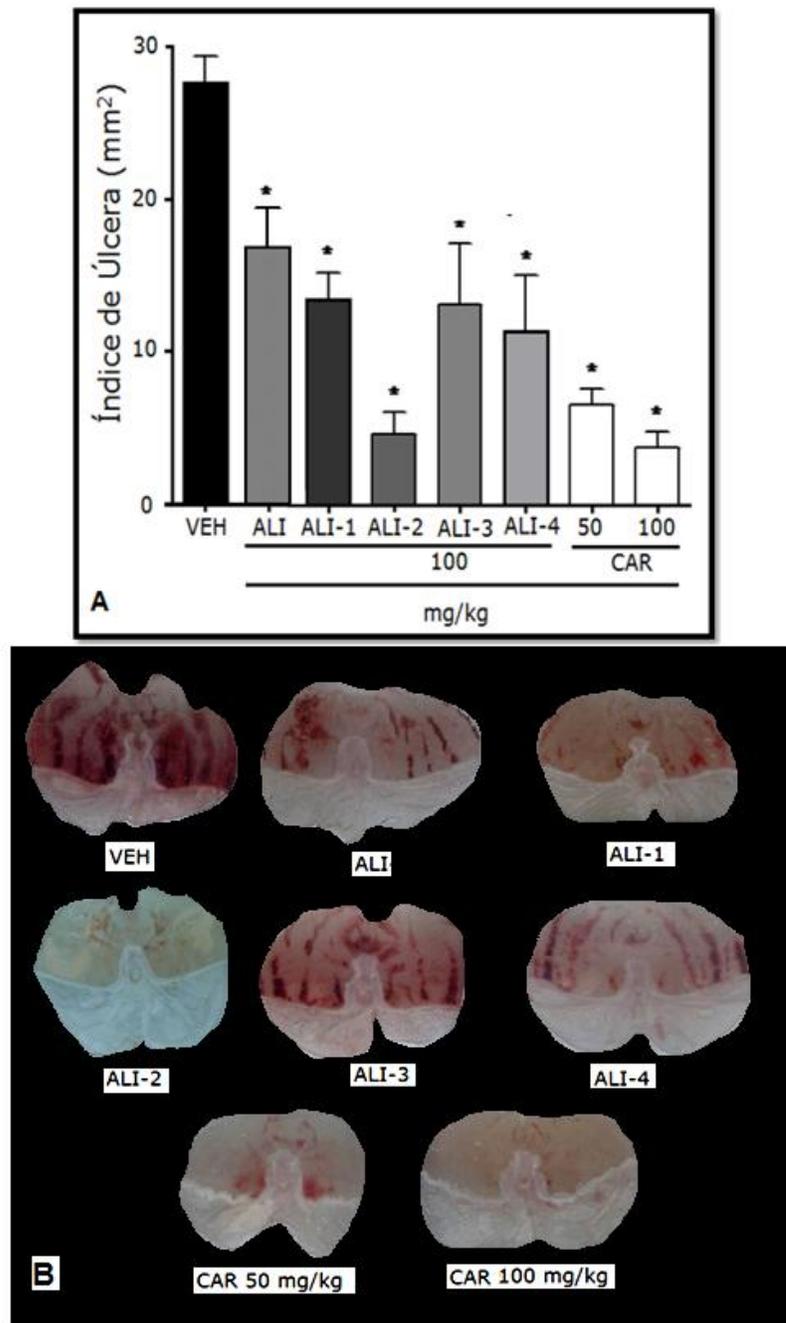
Las úlceras pépticas (gástricas o duodenales) son lesiones en la mucosa del epitelio gástrico, las cuales están estrechamente relacionadas con *H. pylori* (Kusters *et al.*, 2006). De acuerdo a informes mundiales, aproximadamente el 95% de las úlceras duodenales y el 85% de las úlceras gástricas se produjeron en presencia de la infección por esta bacteria (Kuipers *et al.*, 1995).

Como se mencionó anteriormente, Cortés estableció que la actividad antiulcerosa de ALI en un modelo murino fue del 39%, por lo que en esta ocasión se estudió la actividad gastroprotectora de las fracciones primarias (100 mg/kg) utilizando el modelo de úlcera aguda inducida por etanol absoluto en ratón. Al evaluar las fracciones primarias, se observó que el índice de ulceración disminuyó considerablemente en todas ellas con respecto al grupo control que solo recibió el vehículo (Figura 12-A). Los porcentajes de gastroprotección (%G) fueron del 50, 83, 51 y 59% para ALI-1, ALI-2, ALI-3 y ALI-4, respectivamente, destacándose ALI-2 con el mejor efecto antiulcergénico. De igual forma, al comparar ALI-2 con el extracto total (ALI, 39 %G), se puede deducir que es en ésta fracción en donde se concentran en mayor proporción los metabolitos responsables de la actividad gastroprotectora del extracto.

Cabe destacar que la actividad gastroprotectora de ALI-2 evaluada a 100 mg/kg es muy similar a la del producto puro de referencia carbenoxolona (CAR), el cual presentó un %G del 86%; tomando en

cuenta que este último es un compuesto puro, podemos apreciar el potencial que tiene esta fracción (compuesta aun de varios metabolitos) en la obtención de compuestos bioactivos. Por lo que sería importante continuar con el aislamiento del principio activo de ésta fracción.

En la Figura 12-B se muestran estómagos representativos de este experimento, donde se observa que el área de ulceración del estómago de ALI-2 es muy parecida a la del estómago de CAR (100 mg/kg).



**Figura 12. Efecto gastroprotector del extracto acuoso y fracciones primarias de *A. ludoviciana* subsp. *mexicana* (ALI) en el modelo de úlceras agudas inducidas con etanol absoluto en ratones. A) Índice de Úlceras de los diferentes grupos evaluados, vehículo (VEH), el producto de referencia carbenoxolona (CAR, 50 y 100 mg/kg), ALI y sus fracciones primarias: ALI-1, ALI-2, ALI-3 y ALI-4 (100 mg/kg). Cada barra representa la media de n=6 animales  $\pm$  SEM. B) Estómagos representativos de los animales de cada condición experimental. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas mediante un análisis ANOVA seguida de una prueba de Dunnet. \*P<0.05.**

### **6.1.2 Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria de ALI y sus Fracciones Primarias**

El proceso inflamatorio involucra una serie de eventos inespecíficos que pueden ser provocados por numerosos estímulos o agresiones del medio, o por agentes patógenos biológicos como podría ser la interacción de *H. pylori* con la mucosa gástrica. A nivel macroscópico, la respuesta inflamatoria está acompañada por conocidos signos clínicos como formación de edema, rubor, calor, dolor y desorden de la función tisular (Gómez-Estrada *et al.*, 2011).

La evaluación del potencial antiinflamatorio de ALI y sus fracciones primarias se realizó empleando el modelo del edema auricular agudo en ratón. Este modelo es uno de los más utilizados para la evaluación de nuevos agentes antiinflamatorios; las ventajas que ofrece radican en la rapidez y sencillez para llevarlo a cabo además de que requiere pequeñas cantidades de muestra (Gabor, 2003), algo de vital importancia en productos naturales donde los rendimientos son bajos.

La tendencia general de los resultados que se obtuvieron nos indica que el efecto antiinflamatorio de ALI y sus fracciones primarias (ALI-1, ALI-2, ALI-3 y ALI-4) es menor cuando se aplica de manera tópica que cuando se administra oralmente (Tabla 7). Esto es para ambos agentes edematogénicos usados (xilol y TPA). A continuación analizaremos con más detalle los resultados de administración oral.

**Tabla 7. Actividad antiedematogénica de ALI y sus fracciones primarias.**

<b>(A) Tratamiento Administrado por Vía Tópica</b>			
<b>Muestra</b>	<b>Dosis (mg/oreja)</b>	<b>Solución Irritante</b>	
		<b>Xilol % IE ± SEM</b>	<b>TPA % IE ± SEM</b>
<b>ALI</b>	0.5	38.8 ± 10.2	9.0 ± 6.2
<b>ALI-1</b>	0.5	23.4 ± 6.6	33.8 ± 2.8
<b>ALI-2</b>	0.5	29.4 ± 10.8	10.3 ± 4.0
<b>ALI-3</b>	0.5	31.8 ± 12.8	0 ± 13.2
<b>ALI-4</b>	0.5	0 ± 6.6	0 ± 3.0
<b>Indometacina</b>	0.5	61.3 ± 8.1	73.12 ± 5.03
<b>(B) Tratamiento Administrado por Vía Oral</b>			
<b>Muestra</b>	<b>Dosis (mg/kg)</b>	<b>Solución Irritante</b>	
		<b>Xilol % IE ± SEM</b>	<b>TPA % IE ± SEM</b>
<b>ALI</b>	30	47.3 ± 6.9	0 ± 2.7
	100	47.6 ± 12.4	69.2 ± 4.4
<b>ALI-1</b>	30	30.8 ± 7.4	34.1 ± 12.5
	100	20.7 ± 4.1	39.6 ± 7.7
<b>ALI-2</b>	30	36.7 ± 3.9	11.6 ± 1.5
	100	47.2 ± 5.3	12.0 ± 7.1
<b>ALI-3</b>	30	55.2 ± 11.2	15.7 ± 11.4
	100	51.3 ± 6.7	33.6 ± 4.9
<b>ALI-4</b>	30	41.3 ± 7.3	26.1 ± 4.9
	100	36.5 ± 6.6	7.0 ± 4.2
<b>Indometacina</b>	30	54.8 ± 4.7	53.3 ± 6.7

Se utilizó el modelo de inducción de edema en oreja de ratón con xilol ó TPA. Las muestras fueron administradas por la vía oral o tópica y los valores están expresados como % de Inhibición del Edema ± SEM. Se utilizó como fármaco de referencia a la Indometacina.

La administración oral de ALI, al evaluarse con xilol, presenta un efecto antiinflamatorio bueno con respecto a la indometacina, con porcentajes de inhibición del edema de  $47.3 \pm 6.9\%$  y  $47.6 \pm 12.4\%$  a las dosis de 30 y 100 mg/kg, respectivamente. Cuando se induce el edema con TPA, ALI tiene efecto antiedematogénico ( $69.2 \pm 4.4\%$ ) solo a la dosis de 100 mg/kg. El producto de referencia indometacina presentó valores de  $54.8 \pm 4.7$  y  $53.3 \pm 6.7\%$  (30 mg/kg para xilol y TPA, respectivamente). Cabe señalar que los tratamientos evaluados son fracciones y la indometacina un compuesto puro.

Al realizar un fraccionamiento se espera que la actividad observada en el extracto se concentre en alguna de ellas, sin embargo, al analizar los resultados cuando se utiliza xilol, lo que se observa es que las actividades antiedematogénicas de las fracciones primarias son similares al de ALI. Dado que el fraccionamiento mostró que cada una de las fracciones primarias tenía un patrón cromatográfico diferente (datos no mostrados), podemos decir que el efecto antiedematogénico de ALI, está dado por varios compuestos.

Al analizar los resultados obtenidos con las fracciones utilizando TPA, el resultado es diferente, ya que, las fracciones primarias pierden actividad antiedematogénica al compararlas con el extracto total ALI.

La actividad antiedematogénica, tanto de ALI como de sus fracciones primarias, no es dosis dependiente, bajo ninguna de las dos formas por las que se provocó el edema.

Los mecanismos por los cuales se provoca la inflamación cuando se utiliza como agente irritante xilol y TPA, son diferentes y es por eso que se presentan resultados diferentes al utilizar cada uno de ellos.

La aplicación de xileno o xilol causa una irritación local instantánea e induce la formación de un edema de tipo neurogénico, asociado de manera parcial con la sustancia P; un neurotransmisor presente en el sistema nervioso central de naturaleza peptídica asociado a varias funciones. La liberación de esta sustancia a nivel periférico por neuronas sensoriales causa vasodilatación y extravasación de plasma, participando de esta manera en una inflamación neurogénica. También se ha observado en presencia de xilol, la participación de mediadores inflamatorios como la histamina, cininas y fibrinolisisina (Tao *et al.*, 2011; Eddoukus *et al.*, 2012).

En el caso del uso de ésteres de forbol en modelos inflamatorios agudos, la actividad del TPA involucra la liberación y metabolismo del ácido araquidónico. Su aplicación cutánea se asocia con la agregación plaquetaria y adherencia de neutrófilos y eosinófilos, así como migración y degranulación de mastocitos en la dermis. Eleva el adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y las prostaglandinas E1, E2 y F2. (Gómez-Estrada *et al.*, 2011).

Finalmente, como ya se mencionó, cuando la administración es oral, el efecto mejora, lo cual podría decirnos que el proceso de biotransformación de los metabolitos presentes en *A. ludoviciana* es un paso importante para ejercer su acción.

Como puede apreciarse los valores de SEM (Error Estándar de la Media) presentados son grandes, esto es común tratándose en modelos

*in vivo* debido a la gran variabilidad que se presenta entre los animales, aun cuando se trate de controlar el mayor número de parámetros. De tal manera que consideramos que nuestros resultados pueden ser mejorados, por ejemplo, aumentando el número de individuos de cada grupo.

En resumen, con los resultados descritos hasta este punto y, con la información previamente obtenida por Cortés, podemos concluir que el uso del extracto acuoso de *A. ludoviciana* en la erradicación de *H. pylori* y las enfermedades relacionadas con su presencia es una opción prometedora ya que, no presentó toxicidad aguda y tiene actividad gastroprotectora y antiinflamatoria moderadas. Sin embargo, aún deben realizarse estudios adicionales a nivel subagudo, crónico y clínicos para poder garantizar su empleo.

## **6.2.1 2ª PARTE: FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO DE LA FRACCIÓN ALI-2**

### **6.2.1.1 Fraccionamiento Secundario de ALI-2**

El fraccionamiento secundario de ALI-2 se realizó mediante CCA de gel de sílice como se describió en la sección de metodología. Dicha columna fue eluída con distintas mezclas de disolventes de polaridad creciente como se indica en la Tabla 8. Como resultado de este proceso, se obtuvieron 208 fracciones de 100 mL cada una, las cuales se concentraron en un rotaevaporador. Posteriormente, y de acuerdo a su perfil cromatográfico en capa fina, éstas fracciones se reunieron en 6 grupos de fracciones finales secundarias nombrados A, B, C, D, E y F (Figura 13).

**Tabla 8. Fraccionamiento secundario y mezclas de disolventes utilizadas en la CCA de gel de sílice.**

Fracciones	Polaridad
1-27	AE-H (1:1)
28-47	AE-H (52:48)
48-70	AE-H (55:45)
71-91	AE-H(6:4)
92-106	AE-H(65:35)
107-121	AE-H (7:3)
122-137	AE-H (8:2)
138-154	AE (100%)
155-165	AE-M (95:5)
166-184	AE-M (9:1),
185-196	AE-M (7:3)
197-206	AE-M (1:1)
207-208	M (100%)

AE= acetato de etilo, H= hexano, M= metanol.



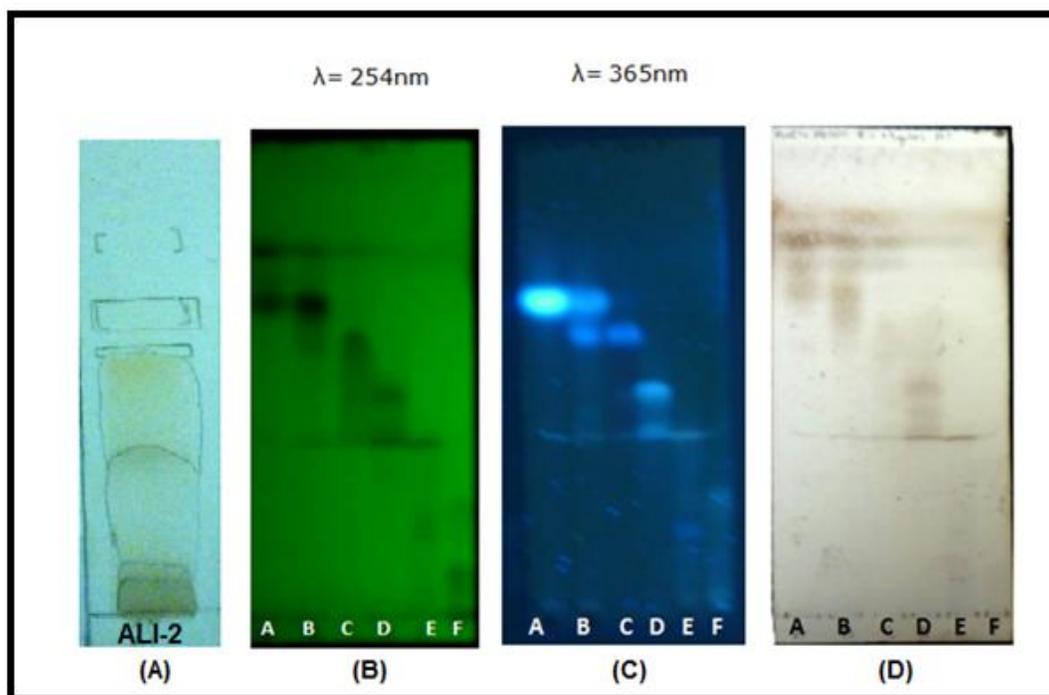
**Figura 13. Fracciones secundarias de ALI-2.**

En la Tabla 9 se muestran los rendimientos obtenidos de cada una de ellos y en la Figura 14, el perfil cromatográfico realizado mediante cromatografía de capa fina (CCF), donde se puede observar que el

fraccionamiento realizado fue satisfactorio, ya que se logra ver una disminución en la complejidad metabólica de las fracciones de acuerdo a las bandas presentadas.

**Tabla 9. Rendimientos de las fracciones secundarias de ALI-2.**

Fracción Secundaria	Rendimiento
A	32.1 mg (2.3 %)
B	45.7 mg (3.3%)
C	208 mg (14.9 %)
D	337 mg (24.1 %)
E	454.6 mg (32.5 %)
F	151.1 mg (10.8 %)



**Figura 14. Cromatografía en capa fina (CCF) de ALI-2 (A) y sus fracciones secundarias;** la placa cromatográfica fue observada a diferentes longitudes de onda ( $\lambda$ ), (B)  $\lambda = 254\text{nm}$ , (C)  $\lambda = 365\text{nm}$  y (D) revelada con sulfato cérico. Placa cromatográfica (20 X 10 cm) de sílica gel 60 GF254, Merck. El sistema de elución es AE-M (9:1) + 3 gotas de ácido fórmico. Los corchetes indican las bandas observadas a 254 nm y los rectángulos indican las bandas observadas a 365 nm.

Dado que el plan de trabajo involucraba un fraccionamiento biodirigido de ALI-2 y, considerando las buenas actividades antibacteriana y gastroprotectora que se habían encontrado previamente para esta fracción, se decidió determinar ambas actividades biológicas a las fracciones secundarias.

#### **6.2.1.2 Actividad anti- *H. pylori***

Las fracciones secundarias obtenidas fueron evaluadas con el método de cultivo líquido Müller-Hinton mencionado en la metodología para determinar su actividad anti-*H. pylori in vitro*. Los resultados obtenidos, expresados en CMIs, se muestran en la Tabla 10, donde se puede observar que al fraccionar ALI-2, cada una de las fracciones secundarias presentan una CMI menor que la fracción primaria (125 µg/mL) de la cual provienen, y a su vez con el extracto acuoso (>250 µg/mL), y podemos percatarnos que conforme se avanza en el fraccionamiento se mejoran notablemente las actividades anti-*H. pylori*. De acuerdo con los resultados obtenidos, se observa que las fracciones A, B y C presentaron la mejor actividad contra la bacteria con valores de CMI= 31.2 µg/mL.

Estos valores de CMI's se consideran buenos al compararlos con la actividad del metronidazol (CMI=300 µg/ml), siendo éste uno de los antibióticos más utilizado en el sector salud; sin embargo, no se logra superar la actividad de la claritromicina y amoxicilina (CMI= 0.5 y 0.05, respectivamente), recordando que dichos antibióticos de referencia son compuestos puros y las fracciones secundarias aún no lo son.

**Tabla 10. Actividad anti-*H. pylori* de ALI, ALI-2, sus fracciones secundarias (A, B, C, D, E y F) y antibióticos de referencia (metronidazol, claritromicina y amoxicilina).**

<b>Fracción Evaluada</b>	<b>CMI (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>
<b>ALI</b>	>250 $\mu\text{g}/\text{mL}$
<b>ALI-2</b>	125 $\mu\text{g}/\text{mL}$
<b>A</b>	31.2
<b>B</b>	31.2
<b>C</b>	31.2
<b>D</b>	62.5
<b>E</b>	125
<b>F</b>	62.5
<b>Metronidazol</b>	300
<b>Claritromicina</b>	0.5
<b>Amoxicilina</b>	0.05

Cabe señalar que, la actividad anti-*H. pylori* del extracto acuoso ALI (>250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) determinada en este trabajo, es mayor a la reportada en el trabajo de Castillo-Juárez y col. del 2009 (125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Es posible, que las diferencias se deban a varias razones, una, la colecta de las plantas es de diferentes temporadas, y dos, en éste trabajo se utilizó el método de dilución en medio líquido mientras que en el trabajo del 2009 se utilizó el método de vertido en placa, en el cual, no se garantiza la dilución de los componentes y por ende, su distribución homogénea en el medio.

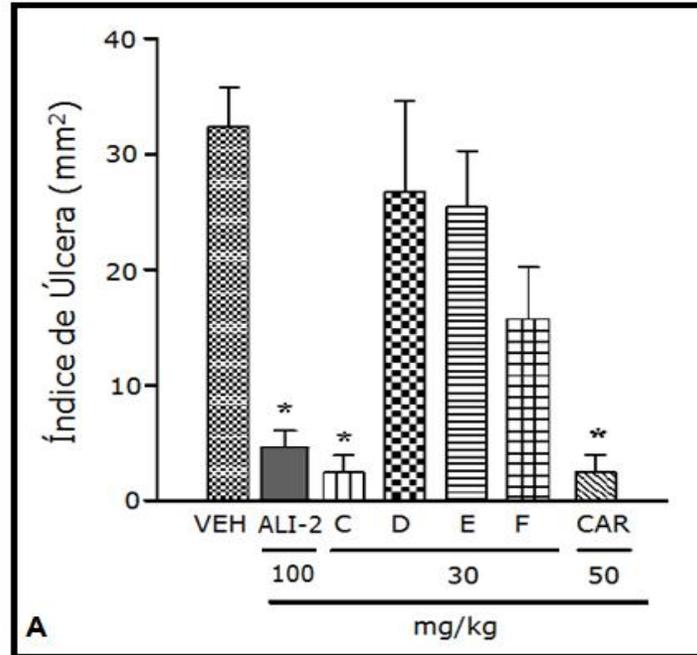
### 6.2.1.3 Actividad Gastroprotectora

Se utilizó nuevamente el modelo de úlcera aguda inducida por etanol absoluto en ratón; sin embargo, debido a que para esta determinación se requiere una mayor cantidad de muestra y con base al rendimiento obtenido de cada una de las fracciones secundarias (ver Tabla 9), solamente se pudieron evaluar las fracciones C, D, E y F a una dosis de 30 mg/kg.

En la Figura 15 A se presentan los resultados obtenidos. Se observa una mayor disminución en el índice de úlcera en la fracción C con un %G= 93%, el cual es similar al efecto presentado por la carbenoxolona con un %G= 94%. Hay que hacer notar que ALI-2, que aún es una fracción cruda, fue evaluada a una dosis de 30 mg/kg mientras que la carbenoxolona, evaluada a una dosis mayor, 50 mg/kg, es un compuesto puro y ambos presentan resultados similares.

También podemos observar una disminución en el índice de úlcera en la fracción secundaria C con una actividad un %G= 93% con respecto al de la fracción primaria ALI-2, con un %G= 86%, con lo que podemos deducir que en la fracción C se encuentran la mayoría de los metabolitos responsables de la actividad gastroprotectora.

En la figura 15 B se muestran estómagos representativos de los tratamientos evaluados donde se puede observar el área de ulceración de los mismos y se confirman los resultados obtenidos.

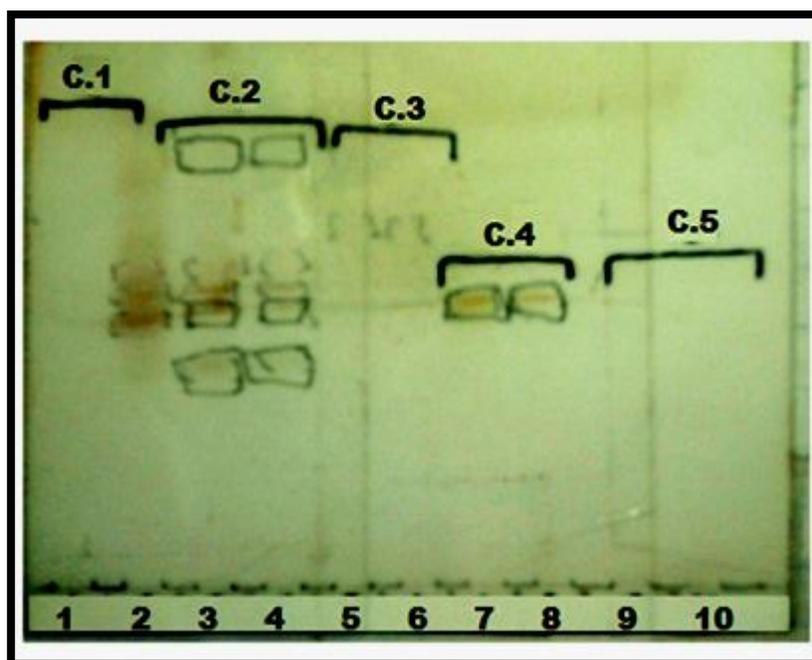


**Figura 15. Efecto gastroprotector de las fracciones C, D, E y F (30 mg/kg) en el modelo de inducción de úlceras agudas con etanol absoluto en ratones.** A) Índice de Ulceración de las diferentes muestras, vehículo (VEH), el fármaco de referencia carbenoxolona (CAR), ALI-2 y sus fracciones secundarias: C, D, E y F. Cada barra representa la media de n=6 animales  $\pm$  SEM. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas mediante un análisis ANOVA seguida de una prueba de Dunnet. \* $P < 0.05$ . B) Estómagos representativos de los animales de cada condición experimental.

#### 6.2.1.4 Fraccionamiento Terciario de ALI-2

Posteriormente y de acuerdo a la actividad anti-*H. pylori*, la actividad gastroprotectora y el rendimiento, se decidió continuar con el fraccionamiento terciario de la fracción C.

Considerando la polaridad de la fracción C se decidió realizar el fraccionamiento en una columna abierta de Sephadex LH-20, utilizando como fase móvil metanol. Para ello, se disolvieron 181.4 mg de la fracción C en metanol y se cargaron en la columna, de acuerdo a la técnica descrita en la sección de métodos. Al final se obtuvieron 10 fracciones terciarias las cuales se reunieron, de acuerdo a su orden de elución (Figura 16), en 5 grupos nombrados **C.1, C.2, C.3, C.4 y C.5**, cuyos rendimientos se muestran en la Tabla 11.



**Figura 16.** Cromatografía en capa fina (CCF) de las fracciones terciarias de C; la placa cromatográfica fue revelada con sulfato cérico amoniacal. Placa cromatográfica (10 X 10 cm) de sílica gel 60 GF254, Merck. El sistema de elución es DM-M (9:1) + 3 gotas de ácido fórmico. Los corchetes indican las bandas observadas a 254 nm y los rectángulos indican las bandas observadas a 365 nm.

A continuación, se determinó la actividad anti-*H. pylori* de las fracciones terciarias y los resultados se presentan en la Tabla 11.

**Tabla 11. Actividad anti-*H. pylori* y rendimientos de las fracciones terciarias provenientes de la fracción secundaria C.**

Fracción	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rendimiento
ALI	>250	
ALI-2	125	
C	125	
C.1	31.2	33.2 mg (18.3%)
C.2	31.2	16.7 mg (9.2%)
C.3	ND	4.9 mg (2.7%)
C.4	31.2	102.1 mg (56.3%)
C.5	125	15.6 mg (8.6%)
Metronidazol	300	
Clarithromicina	0.5	
Amoxicilina	0.05	

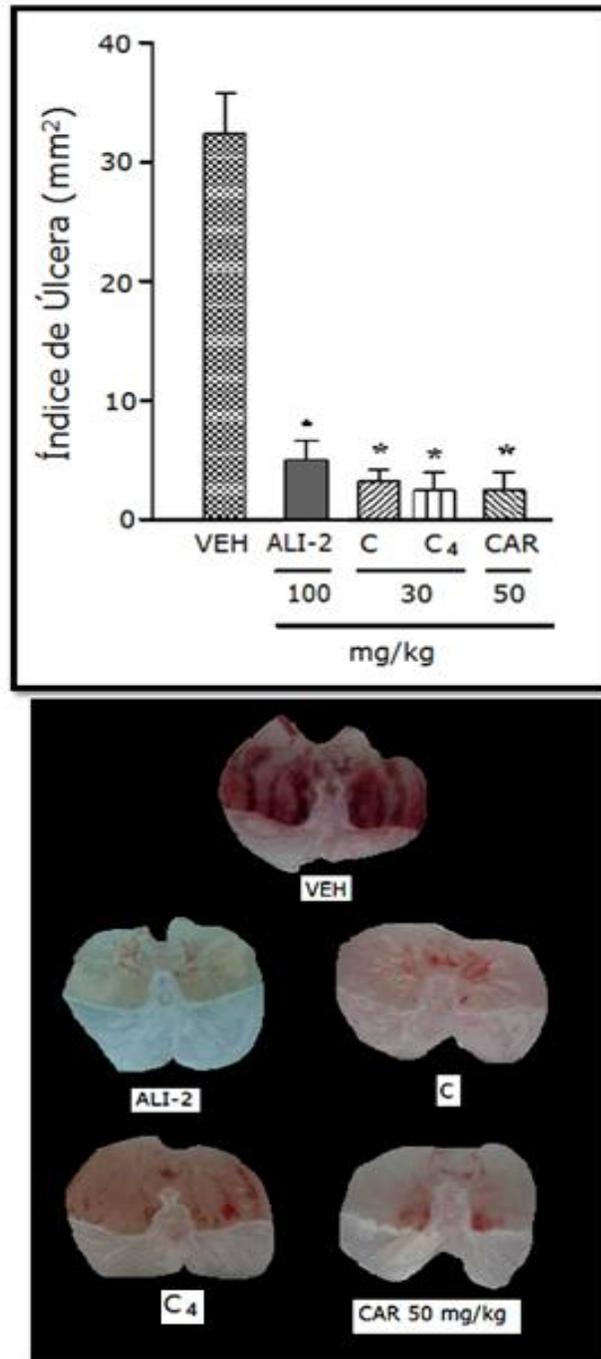
ND=No Determinada

Como puede observarse, las fracciones terciarias C.1, C.2 y C.4, presentan entre ellas, la misma actividad contra la bacteria con una CMI de 31.2  $\mu\text{g/mL}$ . Al comparar los valores de CMI de estas fracciones terciarias con la fracción secundaria C (125  $\mu\text{g/mL}$ ), con la primaria ALI-2 (125  $\mu\text{g/mL}$ ) y a su vez con ALI (>250  $\mu\text{g/mL}$ ), podemos darnos cuenta que conforme continúa el fraccionamiento mejoran considerablemente el efecto anti-*H. pylori*. En lo que respecta a los antibióticos de referencia, cabe destacar que C.1, C.2 y C.4, aun siendo fracciones tienen mejor actividad que el metronidazol (CMI= 300

$\mu\text{g/mL}$ ). En cuanto a las otras fracciones terciarias, C.5, presento una actividad de  $125 \mu\text{g/mL}$  y, debido al bajo rendimiento, la fracción C.3 no se le pudo determinar la actividad.

Cabe hacer notar, que la complejidad de las fracciones terciarias disminuyó considerablemente con respecto a la fracción C de la cual se partió para hacer el fraccionamiento ya que aparentemente se observan pocas bandas, en particular la fracción C.4, la cual se obtuvo como un sólido de color amarillo (Figura 18), y presenta una sola banda en la CCF (Figura 16).

Con base en la actividad antibacteriana (CMI=  $31.2 \mu\text{g/mL}$ ) y el rendimiento presentado por la fracción C.4, se decidió evaluar su actividad gastroprotectora. Como se puede observar en la Figura 17, la actividad antiulcerogénica de la fracción C (%G= 90%) es muy similar a la que presenta la fracción C.4 (%G= 92%) por lo que podemos inferir que dicha fracción debe ser una de las responsables de la actividad gastroprotectora de la fracción C y de ALI-2 (%G= 84). La actividad gastroprotectora de C.4 fue muy similar a la actividad del producto de referencia carbenoxolona (%G= 91%) a una dosis de 50 mg/kg.



**Figura 17. Efecto gastroprotector de ALI-2 (100 mg/kg, *p.o.*), C y C.4 (30 mg/kg, *p.o.*) en el modelo de inducción de úlceras agudas con etanol absoluto en ratones.** A) Índice de ulceración de las diferentes muestras, vehículo (VEH), el fármaco de referencia carbenoxolona (CAR, 50 mg/kg, *p.o.*). Cada barra representa la media de  $n=6$  animales  $\pm$  SEM. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas mediante un análisis ANOVA seguida de una prueba de Dunnet. \* $P<0.05$ . B) Estómagos representativos de los animales de cada condición experimental.

#### 6.2.1.5 Análisis de la Fracción C.4

Dado que la fracción C.4 demostró presentar una buena actividad anti-*H. pylori* (31.2 µg/mL), un porcentaje de gastroprotección alto (%G= 92%), aparentaba ser una sola banda en la CCF y su rendimiento fue el mayor, se decidió analizar mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN). El análisis espectroscópico (RMN-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, Figura 19 y 20), además de su comparación con los datos reportados en la literatura (Kolak *et al.*, 2009), permitieron establecer la identidad de este producto como la flavona eupatilina, la cual ya había sido reportada previamente en un extracto diclorometánico de esta planta en la Tesis de Maestría de Balderas-López en el 2006.

Cabe señalar que es la primera vez que se le asigna la propiedad anti-*H. pylori* a la eupatilina.



**Figura 18. Muestra del compuesto aislado (Eupatilina).**

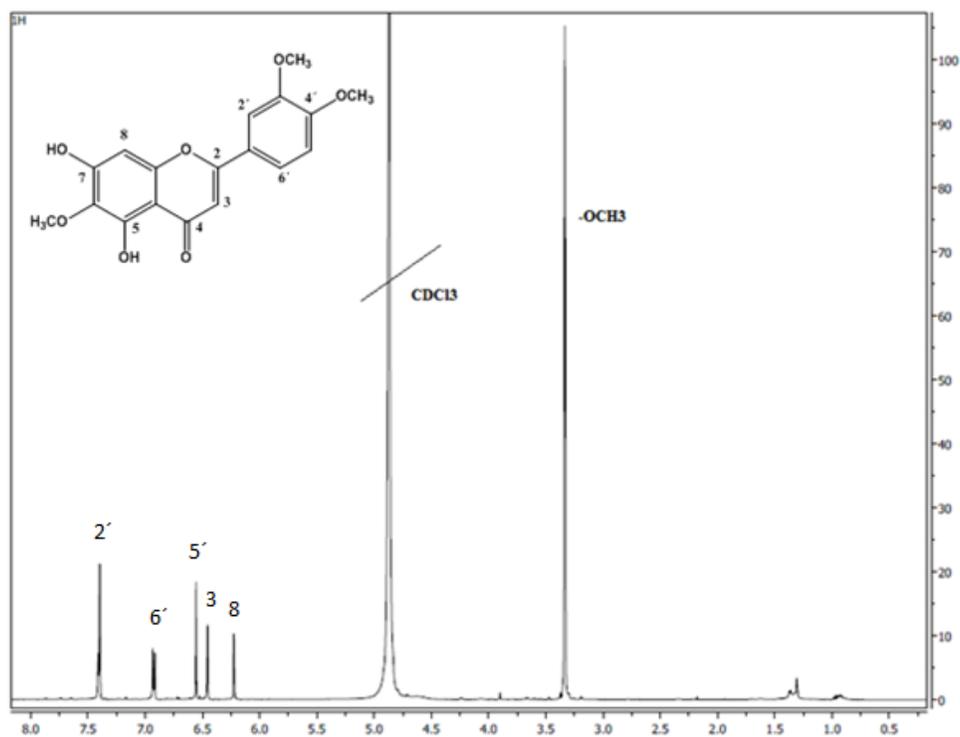


Figura 19. Asignación de los correspondientes espectros de RMN-  $^1\text{H}$  de la eupatilina.

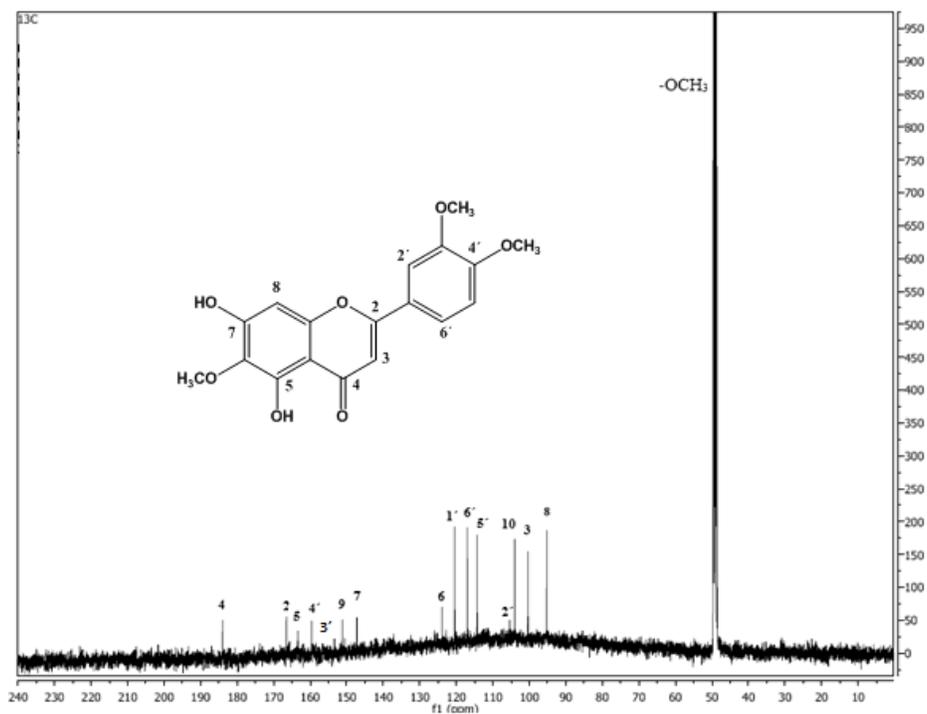


Figura 20. Asignación de los correspondientes espectros de RMN-  $^{13}\text{C}$  de la eupatilina.

#### **6.2.1.6 Eupatilina**

La flavona eupatilina ha sido ampliamente estudiada por sus propiedades gastroprotectoras y antiinflamatorias. En el 2003 Jang y colaboradores, reportaron que el mecanismo de protección a la mucosa gástrica de dicha flavona, involucra la producción de moco, secreción de bicarbonato y aumento de los niveles de prostaglandinas (PG's), los cuales son mecanismos que mejoran la velocidad del flujo sanguíneo en la mucosa. Por su parte, Sung-Wong y colaboradores en el 2009 reportaron que la eupatilina, inhibe la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la reducción de los niveles del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas 1 beta (IL-1 $\beta$ ), factores involucrados en el mecanismo de inflamación.

Se ha aislado la eupatilina a partir de diferentes especies del género *Artemisia* (Tabla 12), sin embargo, no es exclusiva de estas plantas.

<b>Tabla 12. Identificación de Eupatilina en plantas del género Artemisia.</b>	
<b>Planta</b>	<b>Referencia</b>
<i>A. monosperma</i>	Abu-Niaaj <i>et al.</i> , 1996
<i>A. asiática</i>	Kim <i>et al.</i> , 2005
<i>A. alba</i>	Hua y Wang, 2006
<i>A. princeps</i>	Youn-Woo <i>et al.</i> , 2006; Young-Jin <i>et al.</i> , 2008; Sung-Wong <i>et al.</i> , 2009; Young <i>et al.</i> , 2010; Jae <i>et al.</i> , 2012
<i>A. umbelliformis</i>	Giangaspero <i>et al.</i> , 2009
<i>A. argyi</i>	Young <i>et al.</i> , 2010; Jae <i>et al.</i> , 2012
<i>A. iwayomogi</i>	Young <i>et al.</i> , 2010
<i>A. copa</i>	Young <i>et al.</i> , 2010

También se ha reportado la presencia de la eupatilina en otras plantas que no pertenecen al género *Artemisia*, los cuales se muestran en la Tabla 13.

<b>Tabla 13. Identificación de Eupatilina en otras plantas.</b>		
<b>Planta</b>	<b>Familia</b>	<b>Referencia</b>
<i>Lantana montevidensis</i>	Verbenaceae	Nagao <i>et al.</i> , 2002
<i>Chrysanthemum indicum</i>	Compositae	Tang, 2009
<i>Centaurea arenaria</i>	Asteraceae	Csapi <i>et al.</i> , 2010
<i>Salvia plebeia</i>	Labiatae	Agung <i>et al.</i> , 2012

\*Última consulta realizada el 19 de febrero del 2013.

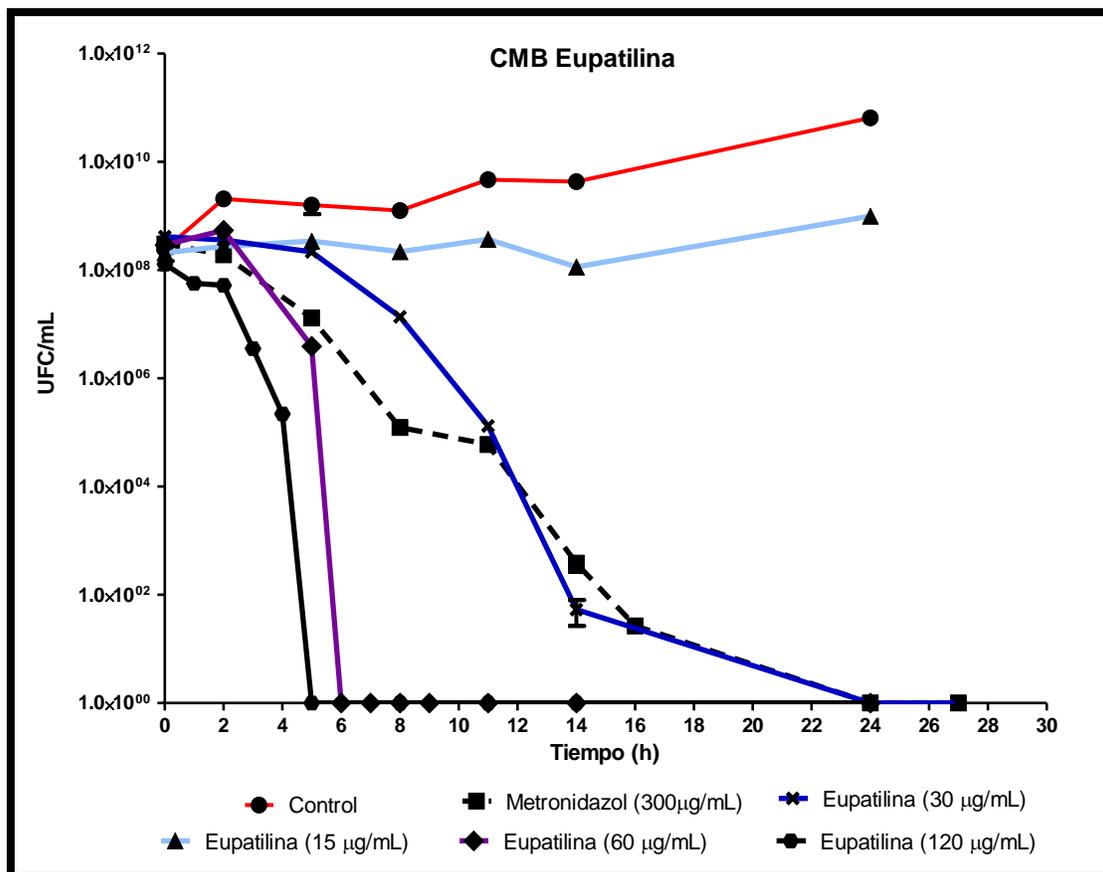
### **6.2.1.7 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de la Flavona Eupatilina**

Los antimicrobianos constituyen la base fundamental en el tratamiento en las enfermedades infecciosas. Cuando el antimicrobiano es el adecuado, se puede garantizar la erradicación de la infección, sin embargo, el mal uso de estos medicamentos así como el empleo de los mismos en otras patologías han favorecido la aparición de mecanismos de defensa creando resistencia hacia los antimicrobianos comerciales. Dicha problemática ha generado la necesidad para el desarrollo o búsqueda de nuevos agentes microbianos que actúen en otros sitios blanco reduciendo así la resistencia de *H. pylori*.

Como mínimo, un agente antimicrobiano debe poseer actividad antimicrobiana y desarrollarla a bajas concentraciones. Como se mencionó anteriormente, la flavona eupatilina posee una CMI=31.2 µg/mL, debido a esto se decidió profundizar en el estudio de su mecanismo básico de acción determinando su CMB, lo cual es muy importante para determinar si posee actividad bactericida o bacteriostática.

Para evaluar la CMB de la flavona eupatilina se utilizaron diferentes concentraciones (15, 30, 60 y 120 µg/mL) y como control positivo metronidazol (300 µg/mL) utilizando la metodología descrita en la sección 5.4.3. En la Figura 21 se muestra el efecto de diferentes concentraciones de eupatilina sobre la curva de crecimiento de *H. pylori*. Se puede observar que con 15 µg/mL la población no aumenta hasta las 14 h de crecimiento, logrado un efecto bacteriostático por lo menos hasta ese tiempo, sin embargo, a las 24 h crece un poco el cultivo. A la

concentración de 30  $\mu\text{g/mL}$  se logra matar el 100% de las bacterias en 24 horas de incubación, siendo esta la CMB de la eupatilina. Si se aumenta la concentración del compuesto a 60 o 120  $\mu\text{g/mL}$ , existe un efecto bactericida a menor tiempo (6 y 5 h, respectivamente), es decir, dicho efecto depende directamente de la concentración de eupatilina utilizada. Por otra parte, si comparamos el efecto de la CMB (30  $\mu\text{g/mL}$ ) de la eupatilina con el fármaco de referencia metronidazol, ambos poseen el mismo efecto bactericida, sin embargo, la eupatilina lo logra a una menor concentración (30  $\mu\text{g/mL}$ ) que el metronidazol (300  $\mu\text{g/mL}$ ), lo que nos indica el gran potencial antibiótico de este compuesto.



**Figura 21. Actividad bactericida de la flavona eupatilina sobre *H. pylori*.** Se utilizaron las concentraciones de eupatilina indicadas y se tomaron alícuotas a los tiempos indicados para realizar la determinación de UFC (unidades formadoras de colonias). Se usó como antibiótico de referencia metronidazol a la concentración indicada.

Sería conveniente analizar en el futuro concentraciones intermedias entre 15 y 30  $\mu\text{g/mL}$  para determinar si es posible lograr el efecto bactericida con una menor concentración.

## 7. CONCLUSIONES

Considerando que la forma más común en la que se utilizan las plantas es la infusión, se partió del extracto acuoso de *Artemisia ludoviciana*. En este trabajo se evaluó la actividad antiinflamatoria y gastroprotectora de dicho extracto acuoso y sus fracciones primarias, así como el fraccionamiento biodirigido de la fracción ALI-2 con el objetivo de hallar compuestos anti-*H. pylori* y gastroprotectores que formen parte del tratamiento contra ésta infección.

Con respecto a la actividad gastroprotectora evaluada, el extracto acuoso tuvo una actividad gastroprotectora moderada de un 39% de gastroprotección, y al evaluar sus fracciones primarias, dicha actividad se mejoró notablemente con la fracción de acetato de etilo, la cual obtuvo el mejor efecto antiulcerogénico con un 83% de gastroprotección.

Se estableció el potencial anti-inflamatorio del extracto acuoso y sus fracciones primarias, los mejores resultados se obtuvieron en la administración oral de los tratamientos y utilizando xilol como solución irritante. La administración oral de ALI, al evaluarse con xilol, presenta un efecto antiinflamatorio de moderado a bueno, con porcentajes de inhibición del edema de  $47.3 \pm 6.9\%$  y  $47.6 \pm 12.4\%$  a las dosis de 30 y 100 mg/kg, respectivamente. Las actividades antiedematogénicas de las fracciones primarias, son similares a la de ALI, por lo que podemos concluir que el efecto antiedematogénico de ALI, está dado por varios compuestos, distribuidos en todas las fracciones primarias. La actividad antiedematogénica, tanto de ALI como de sus fracciones primarias, no es dosis dependiente, bajo ninguna de las dos formas por las que se provocó el edema (xilol y TPA).

A partir del fraccionamiento biodirigido de la fracción de acetato de etilo, se obtuvo la flavona eupatilina. Se evaluó la actividad gastroprotectora de dicho compuesto a una dosis de 30 mg/kg y se obtuvo una actividad gastroprotectora de 92%, la cual es mayor que la actividad obtenida por la fracción de acetato de etilo de la que proviene (39%).

Al evaluar la actividad antibacteriana de dicho compuesto, podemos observar su alto potencial anti-*H. pylori*, ya que obtuvo una concentración mínima inhibitoria de 31.2 µg/mL y una concentración mínima bactericida de 30 µg/mL, concluyendo con ésta última determinación que se trata de un compuesto bactericida. Lo anterior es de suma importancia, ya que es la primera vez que se le asigna la propiedad anti-*H. pylori* a la eupatilina.

El uso de plantas medicinales en México es milenario y su conocimiento ha trascendido por generaciones, formando parte fundamental de nuestra cultura. El uso de plantas como parte del tratamiento en enfermedades es una alternativa viable, ya que su fácil acceso y su bajo costo las consolida como una fuente importante para el descubrimiento y utilización de nuevos productos en la medicina. Este trabajo aporta evidencias científicas acerca del uso que se le ha dado a *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana* para el tratamiento de diversos padecimientos gástricos y en este caso ante la problemática que implica la infección por *H. pylori*.

## 8. PERSPECTIVAS

Con respecto a ALI-2:

- Dado que varias de las fracciones de ALI-2 tienen actividad anti-*H. pylori* y gastroprotectora, continuar con su fraccionamiento para encontrar otros compuestos activos

Con respecto a la flavona eupatilina:

- Evaluar su actividad en un modelo murino de infección por *H. pylori* para tener un estudio integral para la futura utilización del compuesto en el tratamiento de las patologías relacionadas con la bacteria.
- Investigar el mecanismo de acción del compuesto en la actividad anti-*H. pylori*, basado en sus factores de virulencia y colonización, para conocer de forma específica su acción bactericida.
- Investigar su actividad anti-*H. pylori* en aislados clínicos para empezar a evaluar su eficacia clínica.

## 9. ANEXOS

### ANEXO I. Placas y medios para el cultivo de *H. pylori*

- ❖ **Placas de agar sangre para el cultivo de *H. pylori*.** Se prepara agar Casman (42 g/L) en agua destilada en un matraz Erlenmeyer, el cual se somete a esterilización en autoclave durante 20 min a 121°C. Posteriormente, dicho matraz se coloca en un baño de agua caliente y se espera a que el medio alcance una temperatura de aproximadamente 45°C. Una vez que se alcanza la temperatura mencionada y para evitar su desnaturalización se agregan los 4 antibióticos: vancomicina (10 mg/L), anfotericina B (2 mg/L), polimixina (2.5 mg/L) y trimetoprima (5 mg/L) y se suplementa el medio con 5% de sangre de carnero desfibrinada y estéril.
- ❖ **Medio de cosecha.** Se resuspenden 28 g de caldo Brucella (DIFCO) en un litro de agua bidestilada con glicerol al 10% y se somete a esterilización en autoclave durante 20 min a 121°C. Posteriormente dicho medio se deja enfriar y se adiciona 10% de suero fetal bovino estéril y vancomicina (10 mg/L).
- ❖ **Medio de cultivo líquido Müller-Hinton.** Se resuspenden 21 g de medio Müller-Hinton (DIFCO) en un litro de agua destilada y  $\beta$ -ciclodextrina al 0.2%, se somete a esterilización en autoclave durante 20 min a 121°C. El medio se deja enfriar y se agregan 4 antibióticos: vancomicina (10 mg/L), anfotericina B (2 mg/L), polimixina (2.5 mg/L) y trimetoprima (5 mg/L).
- ❖ **Placas para cuentas viables.** Se resuspenden 42 g de agar Casman en un litro de agua destilada y  $\beta$ -ciclodextrina al 0.2%. Se esteriliza a 121°C durante 20 min, se deja enfriar y se adiciona vancomicina (10  $\mu$ g/mL).

## ANEXO II. Pruebas de Identificación de *H. pylori*

- ❖ **Catalasa.** Se colocan unas gotas de peróxido de hidrógeno al 11% y enseguida se adiciona una pequeña cantidad de cultivo con el asa de siembra. La prueba arroja un resultado positivo si hay presencia de burbujas, ya que dicha enzima presente en la bacteria descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.
- ❖ **Oxidasa.** Para esta prueba se utiliza un cuadro de una placa comercial de Dry Slide Oxidase (DIFCO), en la cual se coloca una muy pequeña muestra de cultivo. Dicha prueba se basa en la capacidad que tiene el citocromo C de oxidar al aceptor de electrones artificial, tetrametil o dimetil-*p*-fenilendiamina, esta actividad depende de la presencia de la enzima citocromo oxidasa intracelular que cataliza la reducción del oxígeno molecular por el citocromo C. La aparición de color púrpura en la zona donde se depositó la muestra indica que la bacteria es oxidasa positiva.
- ❖ **Ureasa.** En un tubo de ensayo se colocan 300 µL de una solución de urea (6 M, pH=7, con 0.05% de rojo de fenol) y se agrega una asada de bacterias. La prueba se considera positiva si existe un viraje de color de la solución de anaranjado a rojo intenso debido a la presencia de la enzima ureasa en *H. pylori*. El rojo de fenol, al ser un indicador ácido-base, vira al presentarse un cambio de pH en el medio. Dicha prueba se basa en la presencia de la enzima ureasa en la bacteria, la cual provoca una alcalinización del medio debido a la liberación de moléculas de amonio.
- ❖ **Tinción de Gram.** Se prepara un frotis bacteriano a partir de un cultivo y se realiza la tinción de Gram. Se considera a la bacteria como Gram negativa si se tiñe de rojo al observarse al microscopio y a su vez se verifica la morfología del cultivo identificando formas de bacilos curvos correspondientes a cultivos frescos y formas cocoides para el caso de cultivos viejos.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- ◆ Abu-Niaaj L., Abu-Zarga M. y Abdalia S. (1996) Isolation and inhibitory effects of Eupatilin, a Flavone isolated from *Artemisia monosperma* Del., on rat isolated smooth muscle. *Pharmaceutical Biology*. 34:134-140.
- ◆ Agung N., Myung-Hoe K., Jongwon C., Nam-In B., y Hee-Juhn P. (2012) *In Vivo* Sedative and Gastroprotective Activities of *Salvia plebeia* Extract and Its Composition of Polyphenols. *Archives of Pharmacal Research*. 35:1403-1411.
- ◆ Alanís A. D., Calzada F., Cervantes J. A., Torres J., Ceballos G. M. (2005) Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious disease. *Journal of Ethnopharmacology*. 100:153-57.
- ◆ Amieva M.R. & El-Omar E.M. (2008) Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*. 134: 306-323.
- ◆ Arellanes-Jimenez A., Meckes M., Ramírez R., Torres J. y Luna-Herrera J. (2003) Activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican plants used to treat respiratory diseases. *Phytotherapy Research*. 17:903-908.
- ◆ Argueta A. (1994) *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*. México: INI. 1,2:628-630.
- ◆ Aspholm-Hurtig M., Dailide G., Lahmann M., Kalia A., Ilver D., Roche N., Vikstrom S., Sjostrom R., Linden S., Backstrom A., Lundberg C., Arnqvist A., Mahdavi J., Nilsson U. J., Velapatino, B., Gilman, R. H., Gerhard, M., Alarcon, T., López-Brea, M., Nakazawa, T., Fox, J. G., Correa, P., Dominguez-Bello, M. G., Pérez-Pérez, G. I., Blaser, M. J., Normark, S., Carlstedt, I., Oscarson, S., Teneberg, S., Berg, D. E. y Boren, T. (2004)

- Functional Adaptation of BabA, the *H. pylori* ABO Blood Group Antigen Binding Adhesin. *Science*. 305:519-522.
- ◆ Atherton J.C. The Pathogenesis of *Helicobacter pylori*-Induced Gastro-Duodenal Diseases. (2006) *Annual Review of Pathology-mechanisms of Disease*. 1:63-96
  - ◆ Azevedo N.F., Huntington J., Goodman K.J. (2009) The epidemiology of *Helicobacter pylori* and public health implications. *Helicobacter*. 14:1-7.
  - ◆ Balderas J. L. (2006) Fitoquímica comparativa de *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana* y evaluaciones biológicas preliminares. Tesis Maestría (Maestría en Ciencias Químicas), Facultad de Química, UNAM.
  - ◆ Bizzozero G. (1893) Sulla ghiandole tubupari del tubo gastro-enterico. Appendice: Sulla presenza di batteri nelle ghiandole rettali e nelle ghiandole gastriche del cane. *Centralbl Bakt*. 1:623.
  - ◆ Bork P. M., Schmitz M.L., Weimann C., Kist M., y Heinrich M. (1996) Nahua Indian medicinal plants (México): inhibitory activity of NF-k B as an antiinflammatory model and antibacterial effects. *Phytomedicine*. 3: 263-269.
  - ◆ Bork P. M., Schmitz M.L., Kuhnt M., Escher C., y Heinrich M. (1997) Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor NF-k B. *FEBS Letters*. 402:85-90.
  - ◆ Brodersen D.E., Clemons W.M., Carter A.P., Morgan-Warren R.J., Wimberly B.T., Ramakrishnan V. (2000). The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin and hygromycin B on the 30S ribosoma subunit. *Cell*, 103:1143-1154.
  - ◆ Bruce, M.G.,Maaroos,H.I. (2008). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 13:1-6.

- ◆ Bucciarelli A. y Skliar M. I. (2007) Medicinal plants from Argentina with gastro protective activity. *Ars Pharmaceutica*. 48:361-369.
- ◆ Burgers R., Schneider-Brachert W., Reischl U., Behr A., Hiller K.A., Lehn N., Schmalz G., Ruhl S. (2008). *Helicobacter pylori* in human oral cavity and stomach. *European Journal of Oral Sciences*, 116:297–304.
- ◆ Bye R., Estrada L. E. y Linares M. E. (1995) Recursos genéticos en plantas medicinales de México. Avances en el estudio de los recursos fitogénitos de México. *Sociedad Mexicana de Fitogenética*, 341-359.
- ◆ Calzada F., Yépez-Mulia L., y Aguilar A. (2006) In vitro susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*. 108:367-370.
- ◆ Castanedo J. A. (1906) Anales del Instituto Médico Nacional. Oficina tipográfica de la secretaría de fomento.
- ◆ Castillo-Juárez I., González V., Jaime-Aguilar H., Martínez G., Linares E., Bye R. y Romero I. (2009) Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*. 122:402-405.
- ◆ Castillo-Juárez I. y Romero I. (2007). Plantas con actividad anti-*Helicobacter pylori*: una revisión. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 80:35-61.
- ◆ Cervantes G. E. (2006) *Helicobacter pylori* e infecciones asociadas. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*. 49:163-168.
- ◆ Chisholm S. A., R. J., Owen E. L. Teare y S. Saverymuttu. (2001) PCR-based diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and real-time

- determination of clarithromycin resistance directly from human gastric biopsy samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 39:1217-1220.
- ◆ Chopra I. y Roberts M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. (2001) *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 65:232-60.
  - ◆ Cortés A. (2012) Estudio del efecto anti-*Helicobacter pylori* del extracto acuoso de *Artemisia ludoviciana* subsp. *mexicana*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
  - ◆ Csapi B., Hajdú Z., Berényi A., Forgo P., Szabó P. y Hohmann J. (2010) Bioactivity-guided isolation and antiproliferative compound from *Centaurea arenaria*. *Phytotherapy Research*. 24:1664-1669.
  - ◆ Das J. C. y Paul N. (2007) Epidemiology and pathophysiology of *Helicobacter pylori* infection in children. *Indian Journal of Pediatrics*. 74:287-290.
  - ◆ De Argila M. y Boxeida D. (2001) Consideraciones prácticas para el diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori*. *Medicina Clínica*. 117:386-91.
  - ◆ Dehesa V. (1993). Métodos de diagnóstico en infección para *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 2:87-95.
  - ◆ Dehesa M., Larisch J., Dibildox M., Vega B., Di Silvio M., Rodríguez L., Camorlinga M., Almaguer I., Ramírez-Barba E. y Torres J. (1998) Comparación de dos esquemas basados en pantoprazol para la erradicación de *Helicobacter pylori* en pacientes con úlcera duodenal activa. *Revista de Gastroenterología de México*. 63:66-71.
  - ◆ De Young L. y Young J. M. (1989) Cutaneous models of inflammation for the evaluation of topical and systemic

pharmacological agents. *Pharmacological Methods in the Control of Inflammation* 215–231.

- ◆ Dixon M., Mobley H.L.T., Mendz G.L., y Hazell S.L. (2001). Pathology of Gastritis and Peptic Ulceraton. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. 459-469.
- ◆ Dubal Z.B., Avasthe R.K., Haque N., Toppo S., Murugkar H. V. y Barbuddhe S.B. (2009) Efficacy of medicinal plant extracts and antimicrobials on different serotypes of *Escherichia coli*. *Indian Journal of Animal Sciences*. 79:15-18.
- ◆ Eaton K. A. (1992). Motility is a factor in the colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Journal and Medical Microbiology*. 37:123-127.
- ◆ Eaton K. A., y Krakowka S.. (1992). Chronic active gastritis due to *Helicobacter pylori* in immunized gnotobiotic piglets. *Gastroenterology* 103:1580–1586.
- ◆ Eddouks M., Chattopadhyay D. y Zeggwagh N. A. Animal Models as Tools to Investigate Antidiabetic and Anti-Inflammatory Plants. (2012) *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 14.
- ◆ Eidt S., Stolte M. y Fischer R. (1994) *Helicobacter pylori* gastritis and primary gastric non-Hodgkin's lymphomas. *Journal of Clinical Pathology*. 47:436–439.
- ◆ Escobedo-Hinojosa W. I., Díaz del C. J., Palacios-Espinosa J. F. y Romero I. (2012) Contribution to the ethnopharmacological and-*Helicobacter pylori* knowledge of *Cyrtocarpa procera* Kunth (Anacardiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 143:363-371.
- ◆ Estrada L. E., Reyes T. B. y C. A. Navarro. (1995) Medicina tradicional y herbolaria a 500 años. Lecturas para el Diplomado

Internacional de Plantas Medicinales de México. Universidad Autónoma Chapingo. 73-84.

- ◆ Falkow S. (1997) Perspectives series: host/pathogen interactions. Invasion and intracellular sorting of bacteria: searching for bacterial genes expressed during host/pathogen interactions. *Journal of Clinical Investigation*. 100:239-243.
- ◆ Ferguson D. A., Chuanfu L.I., Patel N. R., Mayberry, W. R., Chi D. S. y Thomas E. (1993). Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva. *Journal of Clinical Microbiology*. 31:2802-2804.
- ◆ Fernández S. S., Ramos G. C., Mata C. D. B., Villareal V. J. y Treviño V.L. (2005) In vitro antiprotozoal activity of the leaves of *Artemisia ludoviciana*. *Fitoterapia*. 76:466-468.
- ◆ Fernández H. (2012). Género *Helicobacter*: un grupo bacteriano en expansión con características zoonóticas. *Gaceta de Infectología y Microbiología Clínica Latinoamericana*. 2:11-20.
- ◆ Ford A. C., Delaney B. C. y Moayyedi P. (2006) Eradication therapy for peptic ulcer disease in *Helicobacter pylori* positive patients. *Cochrane Database Systematic Reviews*.
- ◆ Fox J. y Lee A. (1997). The role of *Helicobacter* species in newly recognized gastrointestinal tract diseases of animals. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 47:222-255.
- ◆ Franco A. T., D. A. Israel M. K., Washington U., Krishna J. G., Fox A. B., Rogers A. S., Neish L., Collier-Hyams G. I., Perez-Perez M. Hatakeyama, R. Whitehead, K. Gaus, D. P., O'Brien J., Romero-Gallo y Peek R. M. (2005). Activation of beta-catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*. *Proceedings of the National Academy of Science*. 102:10646-10651.

- ◆ Fujimura S., Kato S., Nagai K., Kawamura T. y Iinuma K. (2004) Detection of *Helicobacter pylori* in the stools of newborn infants. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 23:1055–1056.
- ◆ Fujimura S., Kato S. y Watanabe A. (2008) Water source as a *Helicobacter pylori* transmission route: a 3-year follow-up study of Japanese children living in a unique district. *Journal of Medical Microbiology*. 57:909–910.
- ◆ Gabor M. (2003) Models of acute inflammation in the ear. *Methods in molecular biology*. 225:129-137.
- ◆ Galal G., Wharburton V., West A., Mapstone N., Axon A.T.R., Hawkey P. y Moayyedi P. (1997). Isolation of *H-pylori* from gastric juice. *Gut*. 41: A40–A41.
- ◆ García S., Alarcón G., Rodríguez C., y Heredia N. (2006) Extracts of *Acacia farnesiana* and *Artemisia ludoviciana* inhibit growth, enterotoxin production and adhesión of *Vibrio cholerae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22:669-674.
- ◆ Gerrits M. M., Van Vliet A. H., Kuipers E. J. y Kusters J. C. (2006). *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *The Lancet Infectious Diseases*. 6:699-709.
- ◆ Giangaspero A., Ponti C., Pollastro F., Del Favero G., Loggia R. D., Tubaro A., Appendino G. y Sosa S. (2009) Topical anti-inflammatory activity of eupatilin, a lipophilic flavonoid from mountain Wormwood (*Artemisia umbelliformis* Lam.) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57:7726-7730.
- ◆ Glocker E. y Kist M. (2004) Rapid detection of point mutations in the *gyrA* gene of *Helicobacter pylori* conferring resistance to ciprofloxacin by a fluorescence resonance energy transfer-based

- real-time PCR approach. *Journal of Clinical Microbiology*. 42:2241-2246.
- ◆ Gómez-Estrada H. A., González-Ruiz K, N. y Domingo-Medina J. (2011). Actividad antiinflamatoria de productos naturales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 10:182-217.
  - ◆ Goodwin C.S., Armstrong J.A., Chilvers T., Peters M., Collins L., Sly L., McConnel W. y Harper W.S. (1989) Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic Bacteriology* 4:397-405.
  - ◆ Goodwin C. S. (1997). Antimicrobial treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Infectious Diseases*. 25:1023-1026.
  - ◆ Gómez M., Otero W. y Gutiérrez O. (2007) Tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. Encuesta en un grupo de médicos generales y especialistas de Colombia. *Revista Colombiana de Gastroenterología*. 22:7-16.
  - ◆ Gramley W.A., Asghar A., Frierson Jr. H.F. y Powell, S.M. (1999). Detection of *Helicobacter pylori* DNA in fecal samples from infected individuals. *Journal of Clinical Microbiology*. 37:2236-2240.
  - ◆ Green W. B., Eaton K. y Krakowka S. (1997) Porcine gastric mucosa associated lymphoid tissue (MALT): stimulation by colonization with the gastric bacterial pathogen, *Helicobacter pylori*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 56:119-131.
  - ◆ Hye Y. J., Sung Y. K., Dong K. K. Ji H. J. y Hye Y. J. (2010) Effects of eupatilin and jaceosidin in cytochrome P450 enzyme activities in human liver microsomes. *Molecules*. 15:6467-6475.

- ◆ Hänninen M. y Hannula M. (2007). Phylogenetic analysis of *Helicobacter* species based on partial gyrB gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57:444–449.
- ◆ Harris P. R., Smythies L. E., Smith P. D. y Dubois A. (2000) Inflammatory cytokine mRNA expression during early and persistent *Helicobacter pylori* infection in nonhuman primates. *The Journal of Infectious Diseases*. 181:783–786.
- ◆ Hazell S. L., Evans D. J. Jr. y Graham D. Y. (1991) *Helicobacter pylori* catalase. *Journal of General Microbiology*. 137:57-61.
- ◆ Higashi H., Tsutsumi R., Fugita A. y Yamasaki S. (2002). Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine fosforilation sites. *Proceedings of the Nationa. Academy of Science*. 99:14428-14433.
- ◆ Hirayama F., Takagi S., Kusuhara H., Iwao E., Yokoyama Y. y Ikeda Y. (1996). Induction of gastric ulcer and intestinal metaplasia in Mongolian gerbils infected with *Helicobacter pylori*. *Journal of Gastroenterology*. 31:755–757.
- ◆ Honda S., Fujioka T., Tokieda M., Gotoh T., Nishizono A. y Nasu M. (1998) Gastric ulcer, atrophic gastritis, and intestinal metaplasia caused by *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 33:454–460.
- ◆ Hua Y. y Wang H. Q. Studies on the flavonoids from whole herbs of *Seriphidium terrae-albae*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 31(10):820-822, 2006.
- ◆ IARC (International Agency for Research on Cancer). (1994) Infection with *Helicobacter pylori*. Schistosomes, Liver flukes and

*Helicobacter pylori*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human. 61:1-241.

- ◆ Ilver D., Arnqvist A., Ögren J., Frick I. M., Kersylyte D., Incecik E. T., Berg D. E., Covacci A., Engstrand L. y Borén T. (1998) *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated hysto-blood group antigens revealed by retagging. *Science*. 279:373-377.
- ◆ Jae C.H., Sun Y. P., Yoonjin N., Thanh T. N., y Vy D. S. (2012) The protective effect of eupatilin against hydrogen peroxide-induced injury involving 5-lipoxygenase in feline esophageal epithelial cells. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*. 16:313-320.
- ◆ Jang J. M, Park K. J., Gookim D., Shim H. J., Ahn B. O, Kim S. H. y Kim W. B. (2003) Pharmacokicenicits of a New Antigastritic Agent, Eupatilin, and Active Component of Stillen®, in Rats. *Journal of Applied of Pharmacology*. 11:163-168.
- ◆ Jones B.D. y Mobley H.L. (1987) Genetic and biochemical diversity of ureases of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella* species isolated from urinary tract infection. *Infection and Immunity*. 55:2198–2203.
- ◆ Juárez-Flores B. I., Jasso-Pineda Y., Aguirre-Rivera J.R., y Jasso-Pineda I. (2010) Efecto de los polvos de asteráceas sobre el gorgojo de maíz (*Sitophilus zeamais* Mostch). *Polibotánica*. 30:123-135.
- ◆ Jung-Won M., Nam-Jae K., Nam-In B. y Dong-Hyun K. (2009) Inhibitory effect of eupatilin and jaceosidin isolated form *Artemisia princeps* on carrageenan-induced inflammation mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 125:497-500.

- ◆ Kato S., Fujimura S., Udagawa H., Shimizu T., Maisawa S. y Ozawa K. (2002) Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains in Japanese children. *Journal of Clinical Microbiology*. 40:649-53.
- ◆ Kiehlbauch J. A., Tauxe R. V., Baker C. N. Y Wachsmuth I. K. (1994). *Helicobacter cinaedi*-associated bacteremia and cellulitis in immunocompromised patients. *Annals of Internal Medicine*. 121:90-93.
- ◆ Kim M. J., Kim D. H., Na H. K., Oh T. Y. Shin C. Y., Sur Ph D. (2005) Eupatilin, a pharmacologically active flavones derived Artemisia plants, induces apoptosis in human gastric cancer (AGS) cells. 24:261-269.
- ◆ Kodama M., Murakami K., Nishizono A. y Fujioka T. (2004) Animal models for the study of *Helicobacter*-induced gastric carcinoma. *Journal of Infection Chemotherapy*. 10:316-325.
- ◆ Kolak U., Hacibekiroglu I., Öztürk M., Özagökce F., Topcu G. y Ulubelen A. (2009) Antioxidant and anticholinesterase constituents of *Salvia pocolata*. *Turk Journal of Chemistry*. 33:813-823.
- ◆ Krakowka S., Eaton K. A. y Rings D. M. (1995). Occurrence of gastric ulcers in gnotobiotic piglets colonized by *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity*. 63:2352-2355.
- ◆ Krakowka S., Ringler S. S., Eaton K. A., Green W. B. y Leunk R. (1996) Manifestations of the local gastric immune response in gnotobiotic piglets infected with *Helicobacter pylori*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 52:159-173.
- ◆ Kuipers E. J., Uytterlinde A. M., Pena A. S., Roosendaal R., Pals G., Nelis G. F., Festen H. P. y Meuwissen S. G. (1995). Long-term sequelae of *Helicobacter pylori* gastritis. *Lancet*. 345:1525-1528.
- ◆ Kundam S. B. y Anupam S. (2011) The Genus *Artemisia*: A Comprehensive Review. *Pharmaceutical Biology*. 49:101-109.

- ◆ Kusters J. G., van Vliet A.H. y Kuipers E.J. (2006) Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 19:449-90.
- ◆ Lehours P y Yilmaz O. (2007) Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 1:1-3.
- ◆ Lee, K. H. y Geissman, T. A. (1970). Sesquiterpene lactone of *Artemisia* constituents of *A. ludoviciana* ssp. *Mexicana*. *Phytochemistry*. 9: 403-408.
- ◆ Leung W., Siu K., Kwok C., Chan S. y Sung, J. (1999). Isolation of *Helicobacter pylori* from vomitus in children and its implication in gastro- oral transmission. *American Journal Gastroenterology*. 94:2881-2884.
- ◆ Li C., Musich P.R., Ha T., Ferguson Jr. Patel N. R., Chi D. S. y Thomas E. (1995) High prevalence of *Helicobacter pylori* in saliva demonstrated by a novel PCR assay. *Journal of Clinical Pathology*. 48:662-666.
- ◆ Li C., Ha T., Ferguson D.A.J., Chi D.S., Zhao R., Patel N.R. Krishnaswamy G. y Thomas E. (1996) A newly developed PCR assay of *H. pylori* in gastric biopsy, saliva, and feces. Evidence of high prevalence of *H. pylori* in saliva supports oral transmission. *Digestive Diseases and Sciences*. 41:2142-2149.
- ◆ Logan R. P. H. y Walker M. M. (2001). ABC of the upper gastrointestinal tract. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *British Medical Journal*. 323:920-922.
- ◆ Lopez A., Hudson J.B. y Towers G.H.N. (2001). Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 77:189-196.
- ◆ Loy C., Irwing L.M. y Katerekeis P.H. (1996) Do commercial serological kits for *Helicobacter pylori* infection differ in accuracy.

- A metaanalysis. *American Journal of Gastroenterology*. 91: 138-1144.
- ◆ Lozoya L. X. (1994) Plantas, medicina y poder, breve historia de la herbolaria mexicana. Editorial Pax. México.
  - ◆ McColl K.E. (1992) *Helicobacter pylori* colonization and alterations in gastric physiology. *Helicobacter pylori and Gastroduodenal Disease*. 198-208.
  - ◆ Maeda S., Ogura K., Yoshida H. y Funai F. (1998) Major virulence factors, VacA and CagA are commonly positive in *Helicobacter pylori* isolates in Japan. *Gut*. 42:338-343.
  - ◆ Mahdavi J., Sondén B., Hurtig M., Olfat F. O., Forsberg L., Roche N., Årmströng J., Larson T., Teneberg S., Karlsson K. A., Altraja S., Wadström T., Kersulyte D., Berg D. E., Dubois A., Petersson C., Magnusson E. K., Norberg T., Lindh F., Lundskog B.B. y Arnqvist A. (2002) *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science*. 297:573-578.
  - ◆ Mapstone N.P., Lynch D.A., Lewis F.A., Axon A. T., Tompkins D. S. Dixon M. F. y Quirke P. (1993) Identification of *Helicobacter pylori* DNA in the mouths and stomachs of patients with gastritis using PCR. *Journal of Clinical Pathology*. 46:540-543.
  - ◆ Marshall B. J. y Warren J. R. (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1:1311-1315.
  - ◆ Marshall B. J., Armstrong J.A., McGeachie D.B. y Glancy R.J. (1985) Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Medical Journal of Australia*. 142:436-439.
  - ◆ Marshall B. J. y Goodwin C.S. (1987) Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 37:68.

- ◆ Mata R., Delgado, G. y Romo del Vivar A. (1984) Sesquiterpene lactones of *Artemisia mexicana* var. *Angustifolia*. *Phytochemistry*. 23:1665-1668.
- ◆ Matsumoto S., Washizuka Y., Matsumoto Y., Tawara S., Ikeda F., Yokota Y. y Karita M. (1997). Induction of ulceration and severe gastritis in Mongolian gerbil by *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Medical Microbiology*. 46:391-397.
- ◆ Mattapallil J. J., Dandekar S., Canfield D. R. y Solnick J. V. (2000) A predominant Th1 type of immune response is induced early during acute *Helicobacter pylori* infection in rhesus macaques. *Gastroenterology*. 118:307-315.
- ◆ Mazari-Hiriart M., Lopez-Vidal Y. y Calva J.J. (2001) *Helicobacter pylori* water systems for human use in Mexico City. *Water Science and Technology*. 43:93-98.
- ◆ Mégraud F. (2000) Strategies to treat patients with antibiotic resistant *Helicobacter pylori*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 16:507- 509 .
- ◆ Megraud F. (2004) *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut*. 53:1374-1384.
- ◆ Megraud, F. y Broutet N. (2000) Review article: have we found the source of *Helicobacter pylori*? *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 14:7-12.
- ◆ Monteiro L., Gras N. y Megraud F. (2001) Magnetic immuno-PCR assay with inhibitor removal for direct detection of *Helicobacter pylori* in human feces. *Journal of Clinical Microbiology*. 39:3778-3780.
- ◆ Mulligen M.E., Murry-Leisure K.A., Ribner B.S., Standiford H.C., John J.F., Karvick J.A., Kauffman C.A. y Yu V.L. (1993) Methicillin

resistant *Staphylococcus aureus*. *American Journal of Medicine*. 94:313-328.

- ◆ Murakami K., Fujioka T., Kodama M., Honda S., Okimoto T., Oda T., Nishizono A., Sato R., Kubota T., Kagawa J. y Nasu M. (2002) Analysis of p53 mutations and *Helicobacter pylori* infection in human and animal models. *Journal of Gastroenterology*. 37:1-5.
- ◆ Nagao T., Abe F., Kinjo J. y Okabe H. (2002) Antiproliferative constituents in plants 10. Flavones from the leaves of *Lantana montevidensis* Briq. and consideration of structure-activity relationship. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 25:875-879.
- ◆ Namavar F., Roosendaal R. y Kuipers E.J. (1995) Presence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity, oesophagus, stomach and faeces of patients with gastritis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 14:234-237.
- ◆ Namita P. y Mukesh R. (2012) Medicinal plants used as antimicrobial agents: a review. *International Research Journal of Pharmacy*. 3:31-41.
- ◆ Navarro V., Villareal M., Rojas G. y Lozoya X. (1996) Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious disease. *Journal of Ethnopharmacology*. 53:143-147.
- ◆ NIH (1994) Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH Consensus Development Panel on *Helicobacter pylori* in Peptic Ulcer Disease. *Journal of the American Medical Association* 272:65-69.
- ◆ Nouraie M., Latifi-Navid S., Rezvan H., Radmard A. R., Maghsudlu M., Zaer-Rezaii H., Amini S., Siavoshi F. y Malekzadeh R. (2009) Childhood hygienic practice and family education status determine

- the prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Iran. *Helicobacter*. 14:40-46.
- ◆ Occhialini A., Urdaci M., Doucet-Populaire F., Bebear CM., Lamouliatte H. y Megraud F. (1997) Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: rapid detection of point mutation and assays of macrolide binding to ribosomes. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 41:2724-2728.
  - ◆ Oda T., Murakami K., Nishizono A., Kodama M., Nasu M. y Fujioka T. (2002) Long-term *Helicobacter pylori* infection in Japanese monkeys induces atrophic gastritis and accumulation of mutations in the p53 tumor suppressor gene. *Helicobacter*. 7:143-151.
  - ◆ Okuda M., Tanaka T., Nakamoto H., Katai A., Nakata H., Koike M. y Miyamoto H. (1996) *Helicobacter pylori* infection in childhood: *H. pylori* isolation rate in gastric juice in relation to positive serum antibody rates. *Journal of Gastroenterology*. 31:6-8.
  - ◆ Oleastro M., Menard A., Santos A., Lamouliatte H., Monteiro L., Barthelemy P. y Megraud F. (2003). Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. *Journal Clinical of Microbiology*. 41:397-402.
  - ◆ Organización Mundial de Gastroenterología. (2010) *Helicobacter pylori* en los países en desarrollo. Guías prácticas de la Organización Mundial de Gastroenterología. *Revista de Gastroenterología Latinoamericana*. 21:165-181.
  - ◆ O'Rourke y Bode. (2001) Morphology and Ultrastructure. Physiology and genetics. *ASM Press Washington*. 53-63.
  - ◆ O'Rourke, J. L., and A. Lee. (2003). Animal models of *Helicobacter pylori* infection and disease. *Microbes and Infection*. 5:741-748.

- ◆ Ortiz A.P., Reis F.C., Ferraz L.F.C., Gerrits M.M., Mendonca S., Kusters J.G., Ottoboni L.M., Ribeiro M.L. y Pedrazzoli J. Jr. (2006) Differentially expressed genes in responses to amoxicillin in *Helicobacter pylori* analyzed by RNA arbitrarily primed PCR. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 50:226-230.
- ◆ Oyofe B.A., Thornton S.A., Burr D.H., Trust T.J., Pavlovskis O.R. y Guerry P. (1992). Specific detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 30:2613–2619.
- ◆ Palacios-Espinosa F., Escobedo-Hinojosa W. y Romero I. (2011) Panorama actual del estudio de las plantas con actividad anti-*Helicobacter pylori*. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 14:51-61.
- ◆ Parsonnet J., Shmueli H. y Haggerty T. (1999) Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 15:2240–2245.
- ◆ Perez-Perez G.I., Rothenbacher D. y Brenner H. (2004) Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 9:1–6.
- ◆ Piddock K.J.V. y Wise R. (1989) Mechanism of resistance to quinolones and clinical perspective. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 23:475-483.
- ◆ Pritchard D. M. y Przemeck S. M. (2004). Review article: how useful are the rodent animal models of gastric adenocarcinoma? *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 19:841–859.
- ◆ Queralt N., Bartolomé R. y Araujo R. (2005). Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human faeces and water with a different levels of faecal pollution in the north-east of Spain. *Journal of Applied Microbiology*. 98: 889-895.

- ◆ Rojas-Alba M. (2009) Evaluación mediante antibiogramas del efecto bactericida de quina amarilla (*Hintonia latiflora* (Sessé et Moc. Ex. DC.) Bullock), cuachalalate (*Hypopterygium adstringens* Schltdl.), tomillo (*Thymus vulgaris* L.), y estafiate (*Artemisia ludoviciana* SSP. *mexicana* (Wild. Ex Spreng.) Keck) en cepas patógenas de *Escherichia coli*. TLAHUI.
- ◆ Ruiz-Cancino A., Cano E. A. y Delgado, G. (1993) Sesquiterpene Lactones and Flavonoids from *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*. *Phytochemistry*. 33:51113-1115.
- ◆ Schnappinger D. y Hillen W. (1996) Tetracyclines: antibiotic action, uptake and resistance mechanisms. *Archives of Microbiology*. 165:359-69.
- ◆ Sen N., Yilmaz O., Simsek I., Kupelioglu A.A. y Ellidokuz H. (2005) Detection of *Helicobacter pylori* DNA by a simple stool PCR method in adult dyspeptic patients. *Helicobacter*. 10:353–359.
- ◆ Shimada T., Ogura K., Ota S., Terano A., Takahashi M., Hamada E., Omata M., Sumino S. y Sassa R. (1994) Identification of *Helicobacter pylori* in gastric specimens, gastric juice, saliva, and faeces of Japanese patients. *The Lancet*. 343:1636-1637.
- ◆ Shimizu N., Inada K., Nakanishi H., Tsukamoto T., Ikehara Y., Kaminishi M., Kuramoto S., Sugiyama A., Katsuyama T. y Tatematsu M. (1999) *Helicobacter pylori* infection enhances glandular stomach carcinogenesis in Mongolian gerbils treated with chemical carcinogens. *Carcinogenesis*. 20:669–676.
- ◆ Singh M., Chaudhry M.A., Yadava J.N.S. y Sanyal S.C. (1992) The spectrum of antibiotic resistance in human and veterinary isolated of *Escherichia coli* collected form 1984-1986 in Northern India. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 29:159-168.

- ◆ Skirrow M.B. (1994) Diseases due to *Campylobacter*, *Helicobacter* and related bacteria. *Journal of Comparative Pathology*. 111:113-149.
- ◆ Slomiany B. L., Piotrowski J. y Slomiany A. (1998) Induction of caspase-3 and nitric oxide synthase-2 during gastric mucosal inflammatory reaction to *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Biochemistry & Molecular Biology International*. 46:1063-1070.
- ◆ Sobala G. M., Crabtree J., Dixon M. F., Schorah C. J., Taylor J. D., Rathbone B. J., Heatley R. V. y Axon A. T. R. (1991) Acute *Helicobacter pylori* infection: clinical features, local and systemic immune response, gastric mucosal histology and gastric juice ascorbic acid concentrations. *Gut*. 32:1415-1418.
- ◆ Souto, R. y Colombo, A.P. (2008). Detection of *Helicobacter pylori* by polymerase chain reaction in the subgingival biofilm and saliva of non-dyspeptic periodontal patients. *Journal of Periodontology*. 79:97-103.
- ◆ Spigelhalter, C., Gerstenecker, B., Kersten, A., Schiltz, E. y Kist, M. (1993) Purification of *Helicobacter pylori* Superoxide Dismutase and Cloning and Sequencing of the Gene. *Infection and Immunity*. 61:5315-5325.
- ◆ Steer H.W. (1975) Ultrastructure of cell migration through the gastric epithelium and its relationship to bacteria. *Journal of Clinical Pathology*. 28:639-646.
- ◆ Sugiyama A., Maruta F., Ikeno T., Ishida K., Kawasaki S., Katsuyama T., Shimizu N. y Tatematsu M. (1998) *Helicobacter pylori* infection enhances N-methyl-N-nitrosourea-induced stomach carcinogenesis in the Mongolian gerbil. *Cancer Research*. 58:2067-2069.

- ◆ Sykora J., Pazdiora P., Varvarovska J., Pomahacova R., Stozicky F. y Siala K. (2006) Current epidemiological and clinical issues regarding *Helicobacter pylori* infection in childhood. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*. 55:3-16.
- ◆ Talley N.J., Fock K.M. y Moayyedi P. (2008) Gastric Cancer Consensus conference recommends *Helicobacter pylori* screening and treatment in asymptomatic persons from high-risk populations to prevent gastric cancer. *The American Journal of Gastroenterology*. 103:510-514.
- ◆ Tang Y., Gao M.H. y Yao M.C. (2009) Studies on flavones from *Flos Chrysanthemi Indici*. *Journal of Chinese Medicinal Materials*. 32:1532-1534.
- ◆ Tao G., Yun-Xia D., Hui X., Chun-Yan Y., Cheng-Cheng C., Sheng-li P y Yang-Lin W. (2011) Antinociceptive and anti-inflammatory activities of ethyl acetate fraction *Zanthoxylum armatum* in mice. *Fitoterapia*. 82:347-351.
- ◆ Torres J., Leal-Herrera Y., Pérez-Pérez G., Gómez A., Camorlinga-Ponce M., Cedillo-Rivera R., Tapia-Conyer R. y Muñoz O. (1998) A Community-Based Seroepidemiologic Study of *Helicobacter pylori* Infection in Mexico. *The Journal Infectious Diseases*. 178:1089-1094.
- ◆ Torres J., López L., Lazcano E., Camorlinga P. M., Flores L. y Muñoz O. (2005) Trends in *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in Mexico. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 14:1874-1877.
- ◆ Trieber C. y Taylor D. (2002) Mutations in the 16S rRNA genes of *Helicobacter pylori* mediate resistance to Tetracycline. *Journal of Bacteriology*. 184:2131-2140.
- ◆ Vaira D., Holton J. y Menegatti. (1999) New immunological assay for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Gut*. 45:23-27.

- ◆ Vakil N. y Mégraud F. (2007) Eradication Therapy for *Helicobacter pylori*. Reviews in basic and clinical Gastroenterology. *Gastroenterology*. 133:985-1001.
- ◆ Vale F.F. y Vitor J.M. (2010) Transmission pathway of *Helicobacter pylori*: does food play a role in rural and urban areas? *International Journal of Food Microbiology*. 138:1–12.
- ◆ Vallejos C.M., Garrido O., Cáceres L., Dante L., Madrid A.M. Defilippi C. y Toledo A. (2007) Prevalence of metronidazole, clarithromycin and tetracycline resistance in *Helicobacter pylori* isolated from Chilean patients. *Revista Médica de Chile*. 135:287-293.
- ◆ Van Duynhoven Y.T. y de Jonge R. (2001) Transmission of *Helicobacter pylori*: a role for food? *Bulletin of the World Health Organization*. 79:455–460.
- ◆ Vandamme P., Falsen E., Rossau R., Hoste B., Segers P., Tytgat R. y De Ley J. (1991) Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter* and *Wolinella* Taxonomy: enmendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 41:88-103.
- ◆ Vandamme P. y Goosens H. (1992) Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter*: a review. *Zentralblatt Fur Bakteriologie*. 276:447-472.
- ◆ Versalovic J., Shortridge D., Kibler K., Griffy M.V., Beyer J., Flamm R.K., Tanaka S.K. Graham D.Y. y Go M.F. (1996) Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 40:477-480.
- ◆ Vasquez A., Valdez Y., Gilman R.H., McDonald J.J., Westblom T.U., Berg D., Mayta H y Gutierrez V. (1996) Metronidazole and clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* determined by

measuring MICs of antimicrobial agents in color indicator egg yolk agar in a miniwell format. The Gastrointestinal Physiology Working Group of Universidad Peruana Cayetano Heredia and the Johns Hopkins University. *Journal of Clinical Microbiology*. 34:1232-1234.

- ◆ Wang X., Sturegard E., Rupar R., Nilsson H., Aleljung P., Carlén B., Willen R. y Wadstrom, T. (1997) Infection of BALB/c A mice by spiral and coccoid forms of *Helicobacter pylori*. *Journal of Medical Microbiology*. 46:657-683.
- ◆ Wang T. C. y Fox J. G. (1998) *Helicobacter pylori* and gastric cancer: Koch's postulates fulfilled? *Gastroenterology*. 115:780-783.
- ◆ Wannmacher L. (2011) Review of the evidence for *H. pylori* treatment regimens. In Technical report series. Report of 18th expert committee on the selection and use of essential medicines. *WHO*.
- ◆ Warren J.R. (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*. 321:1273-1275.
- ◆ Watanabe T., Tada M., Nagai H., Sasaki S. y Nakao M. (1998) *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in Mongolian gerbils. *Gastroenterology*. 115:642-648.
- ◆ [www.abc.net.au/science/news/health/HealthRepublish\\_1474064.htm](http://www.abc.net.au/science/news/health/HealthRepublish_1474064.htm)
- ◆ [www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/artemisia-ludoviciana/fichas/ficha.htm](http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/artemisia-ludoviciana/fichas/ficha.htm)
- ◆ [www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2007/cancer07.pdf](http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2007/cancer07.pdf)
- ◆ [www.macroevolution.net/stomach-bacteria.html](http://www.macroevolution.net/stomach-bacteria.html)

- ◆ [www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Artemisia%20ludoviciana&id=7823](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Artemisia%20ludoviciana&id=7823)
- ◆ [www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2005/#](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2005/#)
- ◆ [www.onmeda.es](http://www.onmeda.es)
- ◆ [www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/959/10/Helicobacter-pylori.-Prevalencia-y-asociacion-con-enfermedades-digestivas](http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/959/10/Helicobacter-pylori.-Prevalencia-y-asociacion-con-enfermedades-digestivas)
- ◆ [www.the-icsp.org](http://www.the-icsp.org)
- ◆ [www.tropicos.org](http://www.tropicos.org)
- ◆ 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. *Infection and Immunity*. 63:94-98.
- ◆ Young-Jin K., Un Ju J., Mi-Kyung L., Hye-Jin K., Seon-Min J., Young B. P., Hae-Gon C., Nam-In B., Kyung T. L., Tae-Sook J., y Myung-Sook C. (2008) Eupatilin, isolated from *Artemisia princeps* Pampanini, enhances hepatic glucose metabolism and pancreatic  $\beta$ -cell function in type 2 diabetic mice. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 82:25-32.
- ◆ Youn-Woo L., Yinzhe J y Kyung H. R. (2006) Extraction and purification of eupatilin from *Artemisia princeps* PAMPANINI recycling preparative HPLC. *Korea Journal of Chemical and Engineering*. 23:279-282.
- ◆ Zavala-Sánchez M.A., Pérez-Gutiérrez S., Pérez-González C., Sánchez-Saldivar D. y Arias-García L. (2002) Antidiarrhoeal activity of nonanal, an aldehyde isolated from *Artemisia ludoviciana*. *Pharmaceutical Biology*. 40:263-268.