



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**ESTUDIO DEL POTENCIAL ANTI-*Helicobacter pylori*, GASTROPROTECTOR Y
ANTIINFLAMATORIO DE *Cyrtocarpa procera***

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
M. en B. WENDY ITZEL ESCOBEDO HINOJOSA

DIRECTORA DE TESIS
DRA. IRMA ROMERO ÁLVAREZ
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ TUTOR
DRA. MARTHA LYDIA MACÍAS RUBALCAVA
INSTITUTO DE QUÍMICA
DRA. GUADALUPE AYALA AGUILAR
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

MÉXICO, D. F. AGOSTO DE 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.

Índice

	Contenido	Página
	Reconocimientos	I
	Agradecimientos	II
	Menciones especiales	III
	Dedicatoria	IV
	Lista de abreviaturas	i
	Lista de figuras	iii
	Lista de tablas	iii
	ABSTRACT	iv
	RESUMEN	vi
1	INTRODUCCIÓN	1
2	ANTECEDENTES	3
2.1	Generalidades de <i>Helicobacter pylori</i>	3
2.1.1	Descubrimiento de <i>Helicobacter pylori</i>	3
2.1.2	Microbiología de <i>Helicobacter pylori</i>	3
2.1.3	Vías de transmisión	3
2.1.4	Colonización, supervivencia y virulencia	5
2.1.5	Respuesta del hospedero frente a la infección por <i>Helicobacter pylori</i>	6
2.1.6	Prevalencia de la infección por <i>Helicobacter pylori</i>	8
2.1.7	Patologías asociadas a la infección por <i>Helicobacter pylori</i>	8
2.1.8	Terapias actuales contra <i>Helicobacter pylori</i>	9
2.1.9	Desventajas de las terapias actuales contra <i>Helicobacter pylori</i>	10
2.1.10	¿Cuándo es recomendable erradicar a <i>Helicobacter pylori</i> ?	10
2.2	Gastritis y úlcera péptica; como problema de salud pública	11
2.3	Descripción de la gastritis y de la úlcera péptica	11
2.3.1	Gastritis aguda	12
2.3.2	Gastritis crónica	12
2.3.3	Úlcera péptica	13
2.4	Proceso resolutivo de la úlcera péptica	13
2.5	Modelos experimentales para el estudio de la resolución de la úlcera gástrica (UG)	15
2.5.1	Modelo de úlcera gástrica inducida por etanol absoluto	15
2.5.2	Modelo de úlcera gástrica inducida por ácido acético	15
2.6	Tratamientos para las úlceras pépticas	15
2.7	Plantas medicinales y salud; una visión global	17
2.8	Contexto de las plantas medicinales en el México actual	18
2.9	Las plantas medicinales como fuente de fármacos	19
2.10	Plantas medicinales empleadas en el tratamiento de gastritis y úlcera gástrica	20
2.11	Las plantas medicinales como fuente de terapias anti- <i>Helicobacter pylori</i>	20
2.12	Generalidades de <i>Cyrtocarpa procera</i>	21
2.12.1	Descripción botánica	22
2.12.2	Taxonomía	22
2.12.3	Sinonimia popular	23

2.12.4	Hábitat	23
2.12.5	Distribución geográfica	23
2.12.6	Antecedentes históricos	24
2.12.7	Uso medicinal	25
2.12.8	Antecedentes de estudios biológicos y fitoquímicos	25
3	JUSTIFICACIÓN	27
4	HIPÓTESIS	28
5	OBJETIVOS	29
6	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	30
6.1	Parte experimental Fase 1	33
6.1.1	Recolección de <i>Cyrtocarpa procera</i>	33
6.1.2	Preparación de los extractos H, D, DM y M	33
6.1.3	Animales de experimentación; cuidados y manejo	33
6.1.4	Fármacos, tratamientos y reactivos	33
6.1.5	Evaluación de la toxicidad aguda de los extractos <i>in vivo</i>	34
6.1.6	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad anti- <i>Helicobacter pylori</i> de los extractos	34
6.1.6.1	Cepa bacteriana y condiciones de cultivo	34
6.1.6.2	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria	35
6.1.7	Evaluación de la actividad gastroprotectora de los extractos <i>in vivo</i>	35
6.1.8	Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos <i>in vivo</i>	36
6.2	Parte experimental Fase 2 del H y del M	37
6.2.1	Obtención a mayor escala de los H y M	37
6.3	Parte experimental Fase 2 para el H	37
6.3.1	Fraccionamiento biodirigido por la actividad anti- <i>Helicobacter pylori</i> del H	37
6.3.2	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad anti- <i>Helicobacter pylori</i> del H	38
6.3.2.1	Determinación de la concentración mínima bactericida del H	38
6.4	Parte experimental Fase 2 para el M	38
6.4.1	Evaluación de la actividad gastroprotectora del M para determinar su posible mecanismo de acción	38
6.4.2	Evaluación de la toxicidad subaguda del M	39
6.4.3	Evaluación del efecto resolutorio de úlcera gástrica del M	39
6.5	Técnicas histológicas e histoquímicas	40
6.5.1	Análisis histopatológico de tejidos	40
6.6	Modelos estadísticos	40
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
7.1	Fase 1 resultados referentes a los cuatro extractos H, D, DM y M	41
7.1.1	Extractos de <i>Cyrtocarpa procera</i>	41
7.1.2	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad anti- <i>Helicobacter pylori</i> de los extractos	42
7.1.3	Evaluación de la toxicidad aguda de los extractos <i>in vivo</i>	43
7.1.4	Evaluación de la actividad gastroprotectora de los extractos <i>in vivo</i>	43
7.1.5	Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos <i>in vivo</i>	52
7.1.6	Conclusiones de la fase 1	54
7.2	Fase 2	55

7.2.1	Resultados referentes al M :	55
7.2.1.1	Mecanismo de acción del M	55
7.2.1.2	Evaluación de la toxicidad subaguda del M	58
7.2.1.3	Evaluación del el efecto resolutivo de úlcera gástrica del M	59
7.2.1.3.1	Análisis histopatológico e histoquímico	62
7.2.2	Resultados referentes al H :	73
7.2.2.1	Obtención de cantidad considerable del H	73
7.2.2.2	Actividad bactericida del H	73
7.2.2.3	Fraccionamiento biodirigido por la actividad anti- <i>Helicobacter pylori</i> del H	73
8	CONCLUSIONES	76
9	PERSPECTIVAS	77
10	APÉNDICE A	78
10.1	Generalidades del estómago	78
10.1.1	Anatomía, histología y fisiología del estómago	78
10.1.2	Secreciones gástricas	80
10.1.3	Mecanismos de defensa de la mucosa gástrica	81
11	APÉNDICE B	82
11.1	Aislamiento e identificación de la mezcla de β -sitosterol y estigmasterol	82
12	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
13	PUBLICACIONES	94

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo, de tesis de doctorado, se realizó en el Laboratorio 2 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Irma Romero Álvarez, con los siguientes apoyos:

Beca CONACYT para estudiantes nacionales de posgrado número 266460.

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, UNAM-DGAPA-PAPIIT (IN225711), Estudio del potencial anti-*Helicobacter pylori*, gastroprotector y antiinflamatorio de plantas medicinales mexicanas selectas.

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento, muy especial, a mi Tutora la Dra. Irma Romero Álvarez por permitirme formar parte de su equipo, por su apoyo académico, enseñanzas, por su amistad y por la infinita confianza que siempre ha depositado en mí.

A los integrantes de Jurado: Dra. Rachel Mata Essayag, Dra. Antonia Castillo Rodal, Dr. Guillermo Delgado y al Dr. Robert Bye, por su tiempo, observaciones y sugerencias, y por su valiosísima autoridad.

A mi comité tutorial, las Dras. Martha Macías Rubalcava y Guadalupe Ayala Aguilar, por su orientación a lo largo del proyecto y por su buena disposición para aclarar mis dudas.

A la Dra. Rosa María Fonseca Juárez, de la Facultad de Ciencias de la UNAM, por la identificación de los individuos recolectados de *C. procera*.

A la Técnico Académico Raquel Guerrero Alquicira, del Departamento de Biología Celular y Tisular, por su destacable asistencia en la realización de las técnicas histológicas.

A la Dra. Rebeca Milán Chávez, del Laboratorio de Metabolismo y Fisiología del Embarazo de la Facultad de Medicina de la UNAM, por su entusiasta participación en la realización de los análisis de bioquímica sanguínea.

Al Dr. Armando Pérez Torres por contagiarme su entusiasmo por la Histología y la Microscopía.

Al Dr. Jorge Guevara Fonseca por las amabilidades prestadas, para la utilización de la infraestructura, para realizar la microscopía.

Al Dr. Guillermo Delgado y a la Dra. Alejandra León por su apoyo en los últimos pasos de purificación de la fracción V₂ y en la identificación de sus componentes.

Al estudiante de medicina Emmanuel Ramírez Ortega por su notable apoyo en diversas etapas del proyecto.

De manera muy especial quiero expresar mi agradecimiento a las Q. F. B. Rebeca Santes Palacios y Karina García Martínez, por su destacable participación en el estudio del extracto hexánico y metanólico respectivamente, por su entusiasta perseverancia pero sobre todo por permitirme aprender a su lado.

MENCIONES ESPECIALES

A mi Mamí, por inculcarme el valor de la responsabilidad y el buen hábito del trabajo.

A mi Papí, por mostrarme lo valioso que es la perseverancia y por buscar siempre la estabilidad familiar.

A mi hermana Cindy, por ser un vivo ejemplo del orden, valentía e independencia.

A mi cuñado Effabiel, por su solidaridad con la familia y por salvarme de tantos desastres computacionales.

A mi hermano Pojhonny, por no rendirse frente a la muerte, ahora sólo falta no rendirse frente a la vida.

A mi hermana Nancy, por demostrar que por más perdida que parezca la causa siempre se puede empezar de nuevo.

A mis sobrinos; David y Emmanuel por su solidaridad, y a Kenya por la entropía que desató el cambio.

A los cachorritos de mi vida; Pepina y sus cachorros, Manjula, Champagne, Negrita, Pirañita, Lila, Camila, Mercurio, Sheldon, Scrappy y Falkor, por su desinteresado amor y compañía, y momentos de verdadera felicidad.

A todos los ratones que contribuyeron con su vida para la realización de esta tesis.

Una mención muy especial para Alex Warnerius Boracito, por ser una persona excepcional, por su infinita paciencia, optimismo, y apoyo.

¡Mil gracias a todos por sus contribuciones sustanciales!

DEDICATORIA

*A Falcor y Scrappy
¡Por supuesto!*



Lista de abreviaturas

Abeviatura	Significado
AA	Azul alciano
AcOEt	Acetato de Etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AG-CPA	Ácido ciclopropil carboxílico
AG-CPE	Ácido ciclopropiliden carboxílico
AINES	Antiinflamatorio no esteroideo
Amoxi	Amoxicilina
ANOVA	Análisis de varianza
APS	Ácido peryódico de Schiff
ATCC	American Type Culture Collection
ATF	13-acetato de 12-Otetradecanoilforbol
ATP	Adenin trifosfato
ATPasa	Adenin trifosfato fosforilasa
BabA	Adhesina de unión a grupos sanguíneos
CagA	Toxina CagA
Cag-PAI	La isla de patogeneicidad Cag
Car 50	Carbenoxolona 50 mg/kg
CCA	Cromatografía en columna abierta
CGRP	Gen de la calcitonina
Clarito	Claritomicina
CMB	Concentración mínima bactericida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
D	Extracto diclorometánico
DGIS	Dirección general de las instituciones de salud
DL ₅₀	Dosis letal media
D-M	Extracto diclorometánico-metanólico
EROS	Especies reactivas de oxígeno
EtOH	Etanol
FDA	Food and drug administration
Glib	Glibenclamida
GRO α	Oncogén regulador del crecimiento α
H	Extracto hexánico
H-E	Hematoxilina-Eosina
IBP	Inhibidor de la bomba de protones
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
INDO	Indometacina
INEGI	Instituto nacional de estadística, geografía e informática
INI	Instituto nacional indigenista
IP	Intraperitoneal
IR	Infrarojo
IU	Índice de úlcera
DL ₅₀	Dosis letal media
L-NAME	Éster metílico de la L-nitroarginina
LPS	Lipopolisacárido
M	Extracto metanólico
M.A.L.T.	Linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa
MeOH	Metanol
Metro	Metronidazol
MEZ	Mezcla de acidos ciclopropil y ciclopropiliden carboxílicos
MDCK	Concentración minima inhibitoria
MHC II	Complejo principal de histocompatibilidad
msnm	Metros sobre el nivel del mar
NEM	N-etilmaleimida

NIH	National Institute of Health
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
pH	Potencial de hidrogeniones
PM	Peso molecular
RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
SabA	Adhesina de unión a ácido siálico
SFB	Suero fetal bovino
SS	Secretaría de Salud
SSI	Solución salina isotónica
S/T	Sin tratamiento
TLR 5	Receptor de tipo accesorio 5
UG	Úlcera gástrica
UI	Unidades internacionales
UreA	Subunidad A de la proteína ureasa
UreB	Subunidad B de la proteína ureasa
UreC	Subunidad C de la proteína ureasa
VacA	Citotoxina vacuolizantes
VEH	Vehículo

Lista de figuras

	Contenido	Página
Figura 1	Microscopía electrónica de barrido de <i>H. pylori</i>	4
Figura 2	Distribución geográfica de <i>C. procera</i>	23
Figura 3	Árbol y corteza de <i>C. procera</i>	26
Figura 4	Estrategia experimental Fase 1	30
Figura 5	Estrategia experimental Fase 2 para el M	31
Figura 6	Estrategia experimental Fase 2 para el H	32
Figura 7	Perfiles cromatográficos de los 4 extractos obtenidos de la corteza de <i>C. procera</i>	41
Figura 8	Actividad anti- <i>H. pylori</i> de los cuatro extractos de <i>C. procera</i> y del antibiótico de referencia metronidazol	42
Figura 9	Curva dosis respuesta del efecto gastroprotector del H	45
Figura 10	Curva dosis respuesta del efecto gastroprotector del M	46
Figura 11	Histopatología. Estómago de ratón sin tratamiento	47
Figura 12	Histopatología. Estómago de ratón tratado con SSI + EtOH abs.	48
Figura 13	Histopatología. Estómago de ratón tratado con Carbenoxolona (50 mg/kg) + EtOH abs.	49
Figura 14	Histopatología. Estómago de ratón tratado con M (300 mg/kg) + EtOH abs.	50
Figura 15	Histopatología. Estómago de ratón tratado con H (300 mg/kg) + EtOH abs.	51
Figura 16	Curva dosis respuesta del efecto antiinflamatorio del H	53
Figura 17	Efecto del pretratamiento con diferentes inhibidores de la vías de gastroprotección sobre la gastroprotección del M	57
Figura 18	Efecto resolutorio del M sobre la UG en las diferentes modalidades	60
Figura 19	Apariencia macroscópica de los estómagos tras 20 días de administración de los diferentes tratamientos	63
Figura 20	Microscopía de una preparación histológica teñida con APS de un estómago normal sin tratamiento	64
Figura 21	Microscopía de una preparación histológica teñida con APS de un estómago tras 20 días de haberse inducido la formación de la UG	65
Figura 22	Microscopía de una preparación histológica teñida con APS de un estómago tratado durante 20 días con M (100 mg/kg; 1 dosis/día)	66
Figura 23	Microscopía de una preparación histológica teñida con APS de un estómago tratado durante 20 días con M (100 mg/kg; 2 dosis/día)	67
Figura 24	Microscopía de una preparación histológica teñida con APS de un estómago tratado durante 20 días con M (300 mg/kg; 2 dosis/día)	68
Figura 25	Microscopía de una preparación histológica teñida con APS de un estómago tratado durante 20 días con carbenoxolona (50 mg/kg; 1 dosis/día)	69
Figura 26	Microscopía de una preparación histológica teñida con APS de un estómago tratado durante 20 días con carbenoxolona (50 mg/kg; 2 dosis/día)	70
Figura 27	Actividad bactericida del H y de los antibióticos de referencia	75
Figura 28	Actividad bactericida de la MEZ y de los antibióticos de referencia	75
Figura 29	Regionalización anatómica del estómago	78
Figura 30	Estructura histológica y constitución celular de la mucosa gástrica	79
Figura 31	Constitución celular y secreciones de la mucosa gástrica	80
Figura 32	Aislamiento de la mezcla de β -sitosterol y estigmasterol	82
Figura 33	Estructuras químicas del β -sitosterol y del estigmasterol	83

Lista de tablas

	Contenido	
Tabla 1	Resumen de resultados de la primer fase experimental	54

ABSTRACT

This dissertation determines the potential of the medicinal plant *Cyrtocarpa procera* for the treatment of *Helicobacter pylori* related diseases.

Cyrtocarpa procera, commonly known as "chupandilla" is a Mexican endemic tree, whose bark is used since prehispanic times to relieve gastrointestinal disorders including gastritis and peptic ulcer disease.

Before it was known that *H. pylori* was the major causative agent of gastritis and peptic ulcer, the search of anti-ulcerogenic and anti-inflammatory agents from medicinal plants had been performed. However, it is until now that its potential for obtaining compounds with anti- *H. pylori* activity has been investigated.

Globally, *H. pylori* infection prevalence is in average 50 %, and the organism is a risk factor for gastric cancer. The reported seroprevalence in Mexico in 1998 was 66 %.

The aim of this study was to evaluate the anti-*H. pylori*, gastro-protective, and anti-inflammatory potential of *C. procera* for the treatment of *H. pylori* associated diseases, such as gastritis and peptic ulcer.

Four different polarity extracts [hexanic (**H**), dichloromethanic (**D**), dichloromethanic-methanolic 1:1 (**DM**) and methanolic (**M**)] from *C. procera* bark were obtained. Each of them was evaluated for its anti-*H. pylori* activity *in vitro* with a broth dilution method and in the following acute murine models: toxicity Lorke test, ethanol-induced gastric ulcer, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced ear edema.

The results indicated that **H** possesses the three assayed pharmacological activities and does not cause acute toxicity. However, its low yield (0.9 %) allowed us to continue only with its anti-*H. pylori* bioguided fractionation, because smaller amounts are required to make the evaluations. On the other hand, **M** has a remarkable gastro-protective activity and a good anti-*H. pylori* effect, was not toxic under acute administration, and has a good yield (13.2 %). So, it is suitable to explore its possible gastro-protective mechanism and its gastric ulcer healing effect on a preexisting ulcerative process.

The **M** gastro-protective mechanisms is partially related with potassium ATP-dependent channels and with sulfhydryl groups and mainly involved with endogenous prostaglandins and nitric oxide, one of the major mechanisms defense of the gastric mucosa due to its effect on vascularity. To determine whether **M** improves the gastric ulcer (**GU**) healing process in an *in vivo* model, sub-acute toxicity was determined before to ensure **M** innocuity. The sub-acute toxicity determination was performed in mice using Lorke model with modifications, in two modalities: I) one dose of **M** per day (10, 100, or 1000 mg/kg) for 20 days, II) two doses of **M** per day (100 or 300 mg/kg) for 20 days. Because there were none detectable toxicity signs in any of the evaluated modalities, we proceed to analyze the **GU** healing effect of **M** as follows: **GU** was induced in mice by intragastric administration of absolute ethanol, after 24 h different **M** treatments were given for 20 days: A) 100 mg/kg-day, and B) two doses of 100 or 300 mg/kg-day. Results indicate that 20 days of

consecutive administration of **M** (100 mg / kg), once or twice a day, favors the **GU** healing process in terms of reducing the number and length of the lesions, while 300 mg/kg of **M** twice a day, besides reducing time resolution, produced a significant improvement in the **GU** healing effect. In all cases, histopathologic and histochemical analyses were confirmatory for the **GU** healing effect.

With respect to **H**, the minimum bactericidal concentration (MBC) determined by the plate dilution method, was 66 µg/mL [4 times the value of the minimum inhibitory concentration (MIC)]. Concentrations of less than 66 and greater than 2.5 µg/mL only exert a bacteriostatic effect. Anti-*H. pylori* bioguided fractionation of **H** allowed the isolation of a mixture of compounds, with MIC and MBC values of 3.9 µg/mL and 15.6 µg/mL respectively, overcoming metronidazole values (MIC=250 and MBC=300 µg/mL), a reference antibiotic commonly used in anti-*H. pylori* therapy. Also, we isolated a mixture of β-sitosterol and stigmasterol (ratio 87.93:12.07 respectively), with a MIC of 62.5 µg/mL. These results indicated the possibility to obtain novel anti *H. pylori* compounds, which structures could be used as lead molecules for the development of new therapeutic strategies.

Considering all the results obtained here, we can state that *C. procera* bark, as a whole entity, has polypharmacological activities, somehow validating the traditional use of this species. The anti-*H. pylori* activity, the nitric oxide and prostaglandin mediated gastroprotection, as well as the gastric ulcer healing effect of *C. procera* demonstrated herein, increases its preclinical value. Therefore, it is promising in the development of an integral treatment for gastritis or peptic ulcer whether or not related with *H. pylori*.

RESUMEN

La presente disertación tuvo como objetivo: determinar el potencial de la planta medicinal *Cyrtocarpa procera*, para el tratamiento de enfermedades asociadas a la bacteria *Helicobacter pylori*.

Cyrtocarpa procera, comúnmente conocida como “chupandilla” es una especie endémica de México. Su corteza se emplea desde tiempos prehispánicos para el tratamiento de padecimientos gastrointestinales, como la gastritis y la úlcera péptica. Antes de asociar a la infección por *H. pylori* como el principal agente causante de la gastritis y la úlcera péptica, las plantas medicinales ya habían sido sujetos de estudio para la búsqueda de agentes antiulcerogénicos y antiinflamatorios. Sin embargo, es hasta ahora que se está estudiando su potencial, para la obtención de compuestos con actividad anti-*H. pylori*.

La infección por *H. pylori* tiene una prevalencia mundial promedio del 50% y está catalogada como un factor de predisposición para el desarrollo de cáncer gástrico, clasificada por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer como carcinógeno tipo 1. En México, para 1998, la seroprevalencia reportada es del 66 %.

El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar la actividad anti-*H. pylori*, gastroprotectora y antiinflamatoria de *C. procera*, y determinar su potencial para el tratamiento de las enfermedades asociadas a la bacteria, como la gastritis y la úlcera péptica.

A partir de la corteza de *C. procera* se obtuvieron cuatro extractos de diferente polaridad [hexánico (**H**), diclorometánico (**D**), diclorometánico-metanólico 1:1 (**D-M**) y metanólico (**M**)]. A cada uno se le determinó su actividad anti-*H. pylori*, por el método de dilución en cultivo líquido, y se evaluó su efecto en los siguientes modelos murinos agudos: toxicidad mediante la prueba de Lorke, úlcera inducida por etanol absoluto y edema auricular inducido por 13-acetato-12-O-tetradecanoilforbol.

Los resultados mostraron, que el **H** posee las tres actividades farmacológicas ensayadas sin generar toxicidad aguda. Sin embargo, su bajo rendimiento (0.9 %), fue limitante para continuar con su estudio. Por lo que se decidió llevar a cabo su fraccionamiento biondirigido, por la actividad anti-*H. pylori*, ya que se requieren cantidades pequeñas para realizar las evaluaciones. Por otro lado, se determinó que el **M** posee la mejor actividad gastroprotectora, una buena actividad anti-*H. pylori*; no genera toxicidad bajo administración aguda, y se obtuvo un buen rendimiento (13.2 %). Por lo que se empleó para continuar con el estudio de la actividad gastroprotectora, explorando su posible mecanismo de acción y su efecto resolutivo sobre un proceso gástrico ulcerativo preexistente.

El mecanismo gastroprotector del **M**, está relacionado parcialmente con el papel de los canales de potasio dependientes de ATP y con los grupos sulfhidrilo, y en mayor medida, con las prostaglandinas endógenas y con la participación del óxido nítrico, uno de los principales mecanismos de defensa de la mucosa gástrica, debido a su efecto sobre la vascularización. Para determinar si el **M** favorece el proceso de resolución de la úlcera

gástrica (**UG**), en un modelo *in vivo*, se determinó su toxicidad subaguda, con el fin de garantizar la inocuidad del **M** en el ensayo de resolución de la **UG**. La evaluación de la toxicidad subaguda se realizó usando como base el modelo de Lorke en ratones, con modificaciones y en dos modalidades durante 20 días en cada caso: I) una dosis (10, 100 o 1000 mg/kg) de **M** por día, II) dos dosis de (100 o 300 mg/kg) de **M** por día. Debido a que no se detectaron signos de toxicidad, bajo ninguna de las modalidades de administración, se procedió con la evaluación del efecto resolutorio del **M** sobre la **UG**, para lo cual, se les indujo a los ratones la **UG** mediante la administración intragástrica de etanol absoluto. Posteriormente, se les administró el **M** por 20 días en dos modalidades: A) una dosis de 100 mg/kg-día, B) dos dosis de 100 o 300 mg/kg-día. Tras 20 días de administración consecutiva de **M** (100 mg/kg), una y dos veces al día, se encontró que favorece el proceso de resolución de la **UG**, en términos de disminución del número y longitud de las úlceras, mientras que la dosis de 300 mg/kg de **M** dos veces al día, además de reducir el tiempo de resolución, mejoró significativamente el efecto resolutorio de la **UG**. En todos los casos, el análisis histopatológico e histoquímico fue confirmatorio para el efecto resolutorio.

Con respecto al **H** se determinó que la concentración mínima bactericida (CMB) fue de 66 µg/mL [cuatro veces el valor de la concentración mínima inhibitoria (CMI)]. Concentraciones inferiores a 66 y mayores a 2.5 µg/mL, solamente ejercen un efecto bacteriostático. El fraccionamiento biodirigido por la actividad anti-*H. pylori* del **H** permitió el aislamiento de una mezcla de compuestos, con una CMI = 3.9 µg/mL y una CMB = 15.6 µg/mL, superando la actividad del antibiótico de referencia metronidazol [CMI = 250 y CMB = 300 (µg/mL)], uno de los antibióticos empleados en las terapias contra la bacteria. También se aisló una mezcla de β-sitosterol y estigmasterol (proporción 87.93:12.07 respectivamente), con una CMI de 62.5 µg/mL. El presente trabajo evidencia que es posible obtener compuestos anti-*H. pylori*, los cuales posteriormente podrían ser empleados como moléculas modelo para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

Los resultados obtenidos en la presente investigación indican que *C. procera*, como entidad posee varias actividades farmacológicas, y validan el uso tradicional de esta especie. Adicionalmente, la actividad anti-*H. pylori*, la gastroprotección, mediada por el óxido nítrico y las prostaglandinas, así como su efecto resolutorio sobre la úlcera gástrica, demostrados en este documento de tesis, incrementan su potencial preclínico. Por lo anterior, es factible su empleo para desarrollar un tratamiento integral para la gastritis y la úlcera péptica asociados o no a *H. pylori*.

1.- INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori es una bacteria polimórfica y Gram negativa, causante de una de las infecciones gastrointestinales más frecuentes, con una prevalencia mundial promedio del 50 %.

Esta bacteria es el agente etiológico principal de la gastritis y la úlcera péptica, también está catalogada como factor I de predisposición para el desarrollo de cáncer gástrico (Atherthon, 2006).

Hasta el momento no se tiene bien establecida la vía de transmisión, pero los reportes sugieren que podría ser gastro-oral, oral-oral o fecal-oral (Azevedo *et al.*, 2009; Kusters *et al.*, 2006).

Una vez que se adquiere la infección, la bacteria coloniza el estómago produciendo dos de los signos más importantes de las enfermedades asociadas a esta, un cuadro inflamatorio crónico y daño de la mucosa gástrica, debido principalmente a que el sistema inmune del hospedero no es capaz de eliminar la infección, y la persistencia de la bacteria aunada a los factores de virulencia de la misma, conducen a diversas patologías (Sibony *et al.*, 2012).

A pesar de que esta infección tiene una elevada prevalencia, un gran porcentaje de los individuos infectados no muestran una sintomatología clínica detectable, mientras que otros desarrollan cuadros más complicados como gastritis crónica atrófica, lo que a la larga da lugar a la úlcera péptica, y una minoría evoluciona hasta cáncer gástrico (Stewart y Ackroyd, 2011; Kusters *et al.*, 2006).

La única manera de tratar las patologías asociadas a la infección por *H. pylori* es erradicando a la bacteria. Para los casos donde es recomendable la erradicación de *H. pylori*, el tratamiento es la triple terapia y para aquellos donde esta falla, se recurre a la terapia cuádruple (Vakil y Megraud, 2007; Vakil, 2006).

Dentro de las causas que inciden sobre el fracaso de las terapias, se encuentran: la resistencia creciente de la bacteria frente a los antibióticos que se emplean en las mismas y la falta de apego por parte del paciente al tratamiento; debido principalmente a que son terapias complejas y agresivas que generan varios efectos secundarios, lo que provoca frecuentemente el abandono del tratamiento por parte del paciente, y deriva en muchos casos en una recurrencia de la infección.

Este es el panorama para aquellos que tienen la solvencia económica para resolver el problema, sin embargo, existe un gran sector de la población que no cuenta con los recursos para cubrir los gastos de la terapia, por lo que la infección no es tratada de manera oportuna, derivando en patologías más complejas que incluso comprometen la vida del paciente (Vakil, 2009; Vakil y Megraud, 2007).

Una de las patologías más frecuentes, asociada a la infección por *H. pylori*, es la úlcera péptica. Tan sólo en México se reportó que en 2008, esta patología es una de las

principales causas de mortalidad general, ocupando el lugar veinte (INEGI/SS. DGIS, 2008), quedando claro que la úlcera péptica constituye un problema de salud pública vigente en nuestro país, con una alta frecuencia de asociación a *H. pylori*.

Por lo que es evidente la necesidad de continuar con la búsqueda de terapias o posibles fármacos novedosos para el tratamiento de las enfermedades asociadas a la bacteria, que sean efectivas y accesibles a la población.

El enfoque del estudio de las plantas medicinales con propiedades gastroprotectoras y/o antiinflamatorias, ha cambiado a raíz del descubrimiento de *H. pylori*, y su identificación como el principal agente causante de la gastritis y la úlcera péptica, por lo que, determinar su potencial para la obtención de compuestos con actividad anti-*H. pylori* es ahora, uno de los principales objetivos de las investigaciones novedosas de este tipo de plantas.

Con respecto a esto último, cabe destacar que en un estudio previo realizado en nuestro laboratorio, se probó la actividad anti *H. pylori* de extractos acuosos y metanólicos obtenidos de 53 plantas medicinales mexicanas empleadas para el tratamiento de padecimientos gastrointestinales, tales estudios revelaron que los extractos de la corteza de *Cyrtocarpa procera* (chupandilla), tienen efecto inhibitorio sobre la bacteria (Castillo-Juárez *et al.*, 2009).

Por lo que para el presente trabajo de tesis se abordaron distintos estudios farmacológicos, toxicológicos y fitoquímicos para determinar el potencial anti-*H. pylori*, gastroprotector y antiinflamatorio de la corteza de la planta medicinal *C. procera*.

2.- ANTECEDENTES

2.1.- Generalidades de *Helicobacter pylori*

2.1.1.- Descubrimiento de *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori (Marshall *et al.*, 1985) Goodwin *et al.*, 1989 fue descubierta en el estómago de pacientes con gastritis y/o úlcera péptica en 1982 por los doctores australianos Marshall y Warren (Warren, 1983). Hasta esa década se pensaba que ninguna bacteria era capaz de sobrevivir bajo condiciones tan ácidas como las del estómago humano. El descubrimiento de *H. pylori* como agente causal de la gastritis y de la úlcera péptica los hicieron merecedores del premio nobel de medicina en 2005. Cabe destacar, que previamente investigadores como Bizzorero y Jaworski, entre otros, habían descrito la presencia de bacterias en el estómago, sin embargo, sus descubrimientos no trascendieron (Graham *et al.*, 1992).

2.1.2.-Microbiología de *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa y microaerofílica, mide aproximadamente entre 3 y 5 μm de longitud y 0.5 μm de diámetro, posee una morfología helicoidal característica y entre dos a seis flagelos unipolares, lo cual le confiere la movilidad que le permite penetrar a través de la mucosa gástrica (figura 1), (Lambert *et al.*, 1995; Goodwin y Armstrong, 1990; Goodwin *et al.*, 1989). Cada flagelo mide 30 μm de largo y aproximadamente 2.5 nm de ancho (Goodwin y Armstrong, 1990), muestra una típica estructura similar a una bombilla en su extremo distal conocida como vaina, que es una extensión de la membrana externa, y se cree que esta estructura la protege del ataque del ácido del estómago (Geis *et al.*, 1993). Dispone de una enzima hidrogenasa que emplea para obtener energía mediante la oxidación de hidrógeno molecular, producido por las bacterias intestinales. Para su crecimiento *in vitro*, requiere condiciones microaerofílicas de O₂ entre 2 y 5 %, de CO₂ entre 5 y 10 %, 37 °C y alta humedad. Precisa medios de cultivo con pH neutro, ricos en nutrientes como glucosa, extracto de levadura, triptona y peptona, suplementados con sangre y suero fetal bovino. Es una bacteria de lento crecimiento, que puede tardar desde 3 y hasta 12 días en desarrollar colonias, las cuales en medio sólido son pequeñas y translúcidas. En el estómago humano se sitúa en la capa de moco de la superficie epitelial, preferentemente en la región del píloro y antro (Dehesa, 1993). Dependiendo del entorno en que se encuentre, puede adoptar la forma de bacilo *in vitro* o de espiral en el estómago, además, puede presentarse en forma cocoide cuando se induce respuesta al estrés causada por pH alcalino, alta temperatura, aumento en la tensión de oxígeno, cultivo prolongado o presencia de antibióticos (Janas *et al.*, 1995). Existe una controversia acerca de la viabilidad de la morfología cocoide, y se plantea que puede ser un mecanismo de resistencia, así como de transmisión de la bacteria (O'Rourke y Bode, 2001).

2.1.3.-Vías de transmisión

La ruta exacta de transmisión de *H. pylori* hasta el momento se desconoce, pero aparentemente las más comunes entre personas son: la oral-oral, fecal-oral o la gastro-oral (Goodman y Correa, 2000). Dicha bacteria tiene una estrecha gama de hospederos, pero se

encuentra casi exclusivamente en el ser humano y algunos primates. Existen reportes de que la bacteria ha sido detectada en heces, saliva y placa dental de algunas personas infectadas (Li *et al.*, 1996). También se ha planteado la posibilidad de su transmisión por medio del agua contaminada en naciones en vías de desarrollo, debido a la carencia de una infraestructura sanitaria adecuada (Hulten *et al.*, 1998).

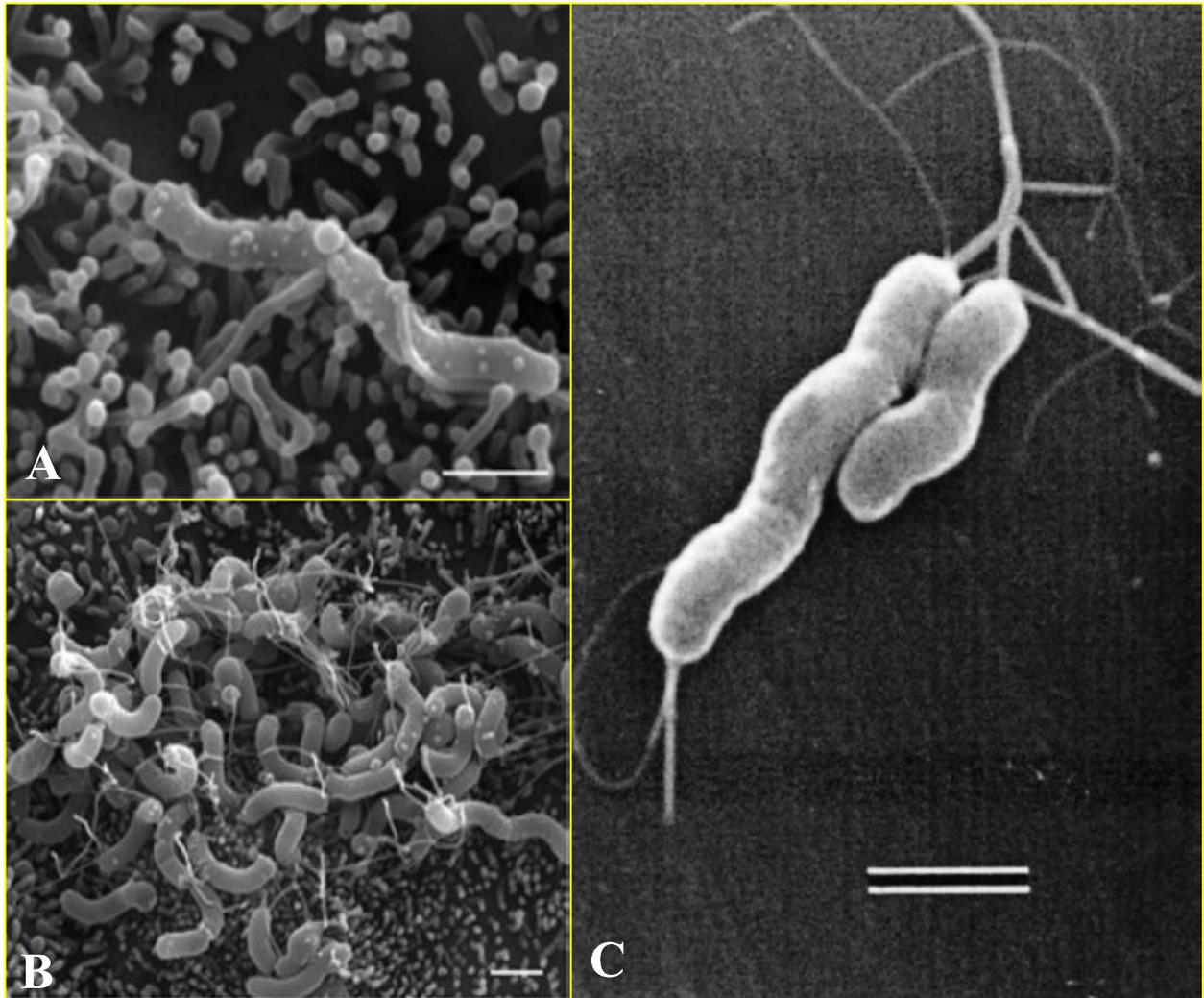


Figura 1. Microscopía electrónica de barrido de *H. pylori*. **A y B)** Colonizando la superficie de células polarizadas de la línea MDCK., (Tan *et al.*, 2009). **C)** Detalle de la morfología helicoidal característica (Yoshiyama y Nakazawa, 2000) (Barra de referencia 1 μ m).

Por otro lado, un cierto número de estudios han propuesto que la adquisición de *H. pylori* se produce a través de una fuente ambiental común. En particular, los animales y el agua han sido contemplados como posibles fuentes de infección (Mitchell, 2001). En raras ocasiones *H. pylori* ha sido aislada de animales domésticos, por lo que, la presencia de éstos puede ser un factor de riesgo para la infección (Dore *et al.*, 2004; Herbarth *et al.*, 2001;). También se ha observado mediante el empleo de técnicas de PCR que las heces de las moscas caseras contienen a la bacteria, por tanto, estos insectos además de ser reservorios, pueden ser vectores importantes para la transmisión (Argyros *et al.*, 2000).

2.1.4.- Colonización, supervivencia y virulencia

Normalmente, la acidez gástrica y la peristalsis inhiben la colonización bacteriana del estómago, sin embargo, la selección natural ha provisto a *H. pylori* con varios mecanismos para evadir estas defensas primarias y establecer una infección persistente.

Los denominados factores de colonización y adherencia (el flagelo, la enzima ureasa y las adhesinas) son elementos esenciales para la colonización de la mucosa gástrica, adicionalmente, los factores de virulencia y supervivencia le permiten permanecer en la mucosa con la consiguiente generación de distintas patologías (Mobley *et al.*, 2001).

La ureasa hidroliza la urea a dióxido de carbono y amoníaco, para amortiguar el pH gástrico, se ha descrito que mutantes de *H. pylori* que carecen de ureasa o de flagelo son incapaces de llevar a cabo el proceso de colonización en animales de laboratorio. La morfología helicoidal y la motilidad polar conferida por los flagelos, le proporcionan la capacidad de realizar movimientos en forma de sacacorchos, lo que le permite penetrar la densa capa de moco gástrico, se sabe que la motilidad es pH dependiente y se abate a pH inferior a cuatro, lo cual se evita con la producción de la enzima ureasa para neutralizar su entorno. Esta enzima tiene tres subunidades (UreA, UreB y UreC), su peso molecular (PM) es de 550 kDa y es fuertemente inmunogénica y quimiotáctica para los fagocitos (Eaton y Krakowka, 1994).

Helicobacter pylori se une específicamente a las células epiteliales de la mucosa gástrica, adhiriéndose a las mucinas tanto *in vivo* como *in vitro* (figura 1). Una vez localizada bajo el moco, se adhiere fuertemente a las células epiteliales mediante las adhesinas BabA, que se unen a los antígenos fucosilados del grupo sanguíneo Lewis b. La interacción entre *H. pylori* y las células gástricas también se puede dar entre sialoglucoconjugados, glucoconjugados sulfatados y varios glucolípidos sialilados y no sialilados. Así, las lesiones inducidas son de tipo adhesión-desprendimiento, que se caracterizan por la pérdida de microvellosidades del epitelio gástrico en el sitio de adhesión (Tummala *et al.*, 2004; Mobley *et al.*, 2001).

La isla de patogenicidad *cag*-PAI es un fragmento genómico de *H. pylori*, que contiene varios marcos de lectura abiertos que representan 31 genes. Un grupo particular de estos genes codifica para un sistema de secreción tipo IV, el cual además de asociarse con la respuesta inmune, inyecta dentro de la célula del hospedero a la proteína CagA y mediante toda una cascada de señalización da lugar a la producción de citocinas y de factor de crecimiento celular. Por otro lado, la citotoxina vacuolizante VacA genera la erosión epitelial gástrica. La presencia, diferencias o ausencia de *cag*-PAI es uno de los marcadores de heterogenicidad altamente relacionados con la capacidad patogénica (Cover y Blaser, 1992).

El Lipopolisacárido (LPS) de membrana de *H. pylori*, es otro mediador de la inflamación y respuesta inmune del hospedero, debido a la activación de células fagocíticas, endoteliales, epiteliales y linfocitos (Innocenti, 2001; Portal-Celhay y Perez-Perez, 2000).

Durante la fase inicial aguda de la infección existe una intensa proliferación bacteriana e inflamación gástrica aguda que es detonada por los factores de virulencia de *H. pylori*, como son la proteína CagA, que induce la producción de Interleucina-8 (IL-8) y el oncogen regulador del crecimiento α (GRO α), promoviendo el reclutamiento continuo de neutrófilos y la extravasación de líquido en la zona, y el LPS, que también es mediador de la respuesta inflamatoria aguda (Innocenti, 2001). La proteína VacA genera la formación de grandes vacuolas, en el citoplasma de las células epiteliales, que se originan a nivel perinuclear, lo que provoca un incremento en el volumen del citosol. Por otro lado, el aumento en la permeabilidad de las células polarizadas tiene como consecuencia la salida de nutrientes y la inducción de la formación de canales a través de la bicapa lipídica. La suma de todos estos procesos genera el daño celular. Cabe mencionar que las cepas de *H. pylori vacA* positivas son más frecuentes en los individuos que presentan un cuadro de úlcera péptica, que en aquellos que sólo presentan gastritis crónica (Morales, 2000; Ogura *et al.*, 2000). De manera adicional, en el proceso inflamatorio también se ven involucradas las fosfolipasas que hidrolizan a los fosfolípidos de las membranas celulares liberando lisolectina, la cual, constituye un factor ulcerogénico. Por otro lado, el reclutamiento, activación y proliferación de eosinófilos y neutrófilos, induce la liberación de citocinas y mediadores inflamatorios (como los metabolitos del ácido araquidónico, radicales libres y factores activadores de plaquetas), lo que provoca una respuesta inflamatoria que lesiona a la mucosa (Hansen *et al.*, 1999).

Como factores de sobrevivencia, la bacteria posee la enzima superóxido dismutasa, que es capaz de romper el superóxido producido en los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos, evitando ser eliminada por estas células del sistema inmune del hospedero, y la enzima catalasa, que la protege contra los efectos dañinos del peróxido de hidrógeno liberado por los fagocitos (Spilgelhalder *et al.*, 1993; Hazell *et al.*, 1991).

La infección persistente, también depende de la habilidad de la bacteria para responder a las condiciones del medio y de la respuesta inmune del hospedero. *Helicobacter pylori* tiene la tasa más elevada de recombinación genética de cualquier especie bacteriana conocida, sugiriendo que ésta cualidad también le confiere ventaja selectiva en la colonización, siendo esta una de las razones de la alta diversidad entre cada uno de los aislados (Loughlin *et al.*, 2003).

2.1.5.-Respuesta del hospedero frente a la infección por Helicobacter pylori

Durante su larga coexistencia con los humanos, *H. pylori* ha evolucionado por medio de complejas estrategias para mantener una inflamación moderada en la mucosa gástrica, limitando la magnitud de la actividad efectora del sistema inmune del hospedero y evadiéndola.

La respuesta inmune frente a los patógenos bacterianos puede dividirse en innata y adaptativa. La primera consiste en un proceso inespecífico que responde rápidamente contra diversas moléculas bacterianas, señalizando el peligro de infección con el objetivo de matar a la bacteria. En contraste, la respuesta adaptativa es retardada, antígeno-específica y permite la activación de células T- o B- y de memoria mediante la producción

de inmunoglobulinas (lo que se define como del tipo celular y del tipo humoral, respectivamente) y es activada por la respuesta innata (Portal-Celhay y Perez-Perez, 2006).

La evasión de *H. pylori* a la respuesta innata del hospedero se relaciona con la reducción en la producción de óxido nítrico (NO), el cual es un componente clave de respuesta durante la fase aguda y es un agente antimicrobiano efectivo, producido por los macrófagos al ser estimulados por la presencia de *H. pylori* (Nathan y Shiloh, 2000). El NO es tóxico tanto para las células infectadas como para la bacteria, ya que al ingresar a la célula inactiva a varias de las proteínas relacionadas con la producción de energía, la transducción de señales y la síntesis de ácidos nucleicos, provocando la muerte celular (Gobert *et al.*, 2001). *H. pylori*, produce una enzima arginasa que convierte en urea y L-ornitina a la L-arginina, aprovechando así la urea generada para neutralizar su entorno mediante la acción de la ureasa. Por tanto, la arginasa compite por el sustrato con la NOS₂ del hospedero, que lo convierte en NO (Ramarao y Meyer, 2001).

Se ha demostrado que *H. pylori* puede sobrevivir intracelularmente dentro de los macrófagos, interfiriendo con el efecto de las enzimas lisosomales, de manera similar a *Mycobacterium tuberculosis*. Por lo tanto, a pesar de darse una respuesta innata contra la bacteria, esta no es lo suficientemente efectiva para eliminar la infección (Allen *et al.*, 2000; Ramarao *et al.*, 2000).

Otro punto importante es que el LPS de *H. pylori*, a diferencia del de otras bacterias Gram negativas, es hasta 1000 veces menos inmunogénico para la activación de macrófagos, sugiriendo un proceso de presión selectiva para minimizar la actividad pro-inflamatoria, y así poder permitir la colonización y persistencia de la infección, sin que la bacteria se elimine (Rietschel *et al.*, 1987).

Por otro lado, *H. pylori* al igual que otras α y ϵ proteobacterias posee moléculas de flagelina, que no pueden ser reconocidas por el hospedero ya que el patrón de aminoácidos en su secuencia permite la evasión del reconocimiento, por parte de los receptores de tipo accesorio 5 (TLR5) (Perez-Perez *et al.*, 1995). Sin dejar de mencionar, que también se han observado mutaciones compensatorias para preservar la motilidad bacteriana (Andersen *et al.*, 2005).

Helicobacter pylori, además de sobrevivir a la respuesta inmune innata, también ha evolucionado para enfrentar la respuesta adaptativa y es capaz de bloquear la proliferación de células T- dependiente de antígenos, mediante la producción de VacA, ya que actúa como inmunomodulador, interfiriendo con la vía de señalización de IL-2 (Boncristiano *et al.*, 2003). Otro estudio propone la posibilidad de que el efecto inmunomodulador involucra la interacción directa con las células T- (Gebert *et al.*, 2003). También se ha propuesto que VacA interfiere con la presentación de antígeno, mediada por el complejo principal de histocompatibilidad II (MHC II) (Molinari *et al.*, 1998).

Adicionalmente, la plasticidad del genoma de *H. pylori* contribuye a la persistencia de la bacteria en la mucosa gástrica, a través de todo el proceso de inducción inefectiva de las diferentes respuestas del sistema inmune del hospedero (Robinson *et al.*, 2005).

2.1.6.-Prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori es causante de una de las infecciones más frecuentes, con una prevalencia mundial promedio del 50 %. Por lo general, la infección se adquiere durante los primeros años de vida y tiende a persistir indefinidamente a menos de que sea tratada. La prevalencia se incrementa en la edad adulta y se correlaciona con el nivel socioeconómico, principalmente con las condiciones de vida durante la infancia, higiene y saneamiento, las cuales varían marcadamente alrededor del mundo. Por lo que, la prevalencia de la infección de *H. pylori* muestra una gran variación geográfica (Malaty *et al.*, 1994). En el caso de los países en desarrollo, más del 80 % de la población adquiere la infección por esta bacteria a edad temprana (Perez-Perez *et al.*, 2004), mientras que en países industrializados, sólo el 40 % de la población está infectado y la proporción es menor en niños y adolescentes, que en adultos y personas mayores (Mitchel, 2001; Pounder y Ng, 1995).

Es muy alta la probabilidad de que *H. pylori* haya infectado el estómago humano desde los inicios de la existencia del hombre actual (Linz *et al.*, 2007). Se ha determinado la presencia de antígenos de *H. pylori* en la materia fecal de humanos momificados, asociando al hombre con la bacteria por más de 3000 años (Allison *et al.*, 1999).

Para México se reportó una frecuencia global de infección del 66 %, de acuerdo con la encuesta nacional que utilizó serología, como método de escrutinio, en población abierta en 1998, Los resultados positivos se incrementaron en proporción directa a la edad, y resultó ser mayor del 80 % en personas de 26 años o más (Torres *et al.*, 1998). Así mismo, en el tercer consenso mexicano sobre *H. pylori*, realizado en 2007, se identificó que la infección por esta bacteria se presenta en el 90 % de personas con cáncer gástrico, en el 85–90 % de sujetos con úlcera péptica y en el 51–80 % de enfermos con cuadro de gastritis (Sobrino *et al.*, 2007). Por otro lado, se ha observado que en algunas regiones consideradas de mayor riesgo, como son las zonas altas del estado de Chiapas, se presenta alta incidencia de cáncer gástrico asociado a la bacteria en los grupos indígenas (Molhar *et al.*, 2002). Mientras que en otros estados, como Morelos, se tiende a la disminución de la proporción de sujetos infectados en diferentes grupos de edades, al parecer esta tendencia se debe tanto a componentes genéticos como al grado de urbanización y calidad del agua potable (Torres *et al.*, 2005).

2.1.7.- Patologías asociadas a la infección por *Helicobacter pylori*

La infección por esta bacteria es el agente etiológico principal de distintas patologías del tracto digestivo superior, y está catalogada como un factor de predisposición para el desarrollo de cáncer gástrico (Atherthon, 2006). A pesar de la elevada prevalencia de la infección, un gran porcentaje de los individuos infectados no muestra sintomatología clínica detectable, mientras que otros, si desarrollan alguna patología. (Stewart y Ackroyd, 2011; Kusters *et al.*, 2006).

Actualmente se ha establecido que las principales enfermedades asociadas a *H. pylori* son: gastritis aguda, gastritis crónica, gastritis crónica atrófica, úlcera péptica, metaplasia intestinal, displasia epitelial gástrica, cáncer gástrico y linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa (tipo M. A. L. T.), (Ernst y Gold, 2000).

La infección por *H. pylori* no siempre implica una respuesta sintomatológica en el hospedero, pero si el riesgo de desarrollar alguna patología, tal que, los individuos infectados por la bacteria tienen entre un 10 a 20 % de riesgo de desarrollar úlceras, y del 1 al 3 % de riesgo de desarrollar cáncer gástrico (Ernst y Gold, 2000; Kuipers, 1999; Kuipers *et al.*, 1995). Por lo que la OMS desde 1994, a través de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer catalogó a *H. pylori* como agente carcinógeno tipo I. Considerando lo anterior, se han planteado diversos criterios para su erradicación.

El desarrollo, tipo y gravedad de los trastornos gastrointestinales derivados de la infección por *H. pylori*, depende principalmente de las características inherentes al genotipo de la cepa bacteriana, de la fisiología, genética y hábitos (dieta, ingesta de alcohol y tabaquismo) del hospedero.

2.1.8.- Terapias actuales contra *Helicobacter pylori*

Una vez que las enfermedades anteriormente descritas se han desarrollado, es necesario erradicar a la bacteria, para lo cual se recurre al tratamiento conocido como la triple terapia, que consiste en la prescripción de dos antibióticos como la amoxicilina, claritromicina, metronidazol o tetraciclina, y un inhibidor de la bomba de protones (IBP) durante una o dos semanas. Este tratamiento tiene un 80% de efectividad, por lo que para los casos en que la bacteria no sea erradicada se prescribe la terapia cuádruple, integrada por dos antibióticos diferentes a los indicados en la terapia triple, un IBP y sales de bismuto por una o dos semanas, lo que eleva las posibilidades de erradicar a la bacteria hasta en un 95%.

Otras terapias utilizadas son la secuencial, la terapia dirigida por susceptibilidad y la terapia de rescate donde se emplean nuevos antimicrobianos, tales como la levofloxacina, rifabutina y furazolidona (Vakil y Megraud, 2007; Vakil, 2006).

A partir del establecimiento de *H. pylori* como el agente infeccioso causante de la gastritis, esta bacteria ha sido sujeta a una intensa investigación en diversos campos. Muchas de estas investigaciones están encaminadas a la búsqueda de la terapia más adecuada y actualmente se tienen resultados aceptables, combinando el uso de antibióticos con antiácidos como sucralfato, omeprazol y sales de bismuto (Torres *et al.*, 1998).

A pesar de que *H. pylori* es sensible a una amplia gama de antibióticos *in vitro*, no lo es *in vivo* (Moblely *et al.*, 2001). No obstante, estas combinaciones no siempre son exitosas, principalmente porque las bacterias han desarrollado resistencia a los antibióticos ya existentes, y porque frecuentemente estas terapias producen efectos secundarios perjudiciales para el organismo, sin dejar de mencionar el alto costo de las mismas para el grueso de la población (Wolle y Malfertheiner, 2007).

De ahí que siga latente la necesidad de continuar con la búsqueda de nuevos compuestos que sean activos frente a *H. pylori*. En este sentido, los productos naturales representan una fuente potencial para el hallazgo de los mismos (Castillo-Juárez *et al.*, 2009; Ankli *et al.*, 2002).

2.1.9.- Desventajas de las terapias actuales contra *Helicobacter pylori*

La eficacia de la triple terapia estándar ha disminuido significativamente a nivel mundial, debido principalmente a la creciente prevalencia de la resistencia primaria a los antibióticos, como consecuencia del empleo excesivo de macrólidos, quinolonas, amoxicilina y nitroimidazoles. Por lo tanto, tratar la infección por *H. pylori* en la práctica clínica se ha tornado progresivamente más difícil. Cada vez son más frecuentes los pacientes que requieren más de dos regímenes terapéuticos, y hasta ahora se han obtenido mejores resultados con la terapia secuencial o la dirigida por susceptibilidad (De Francesco *et al.*, 2012).

Otros puntos importantes referentes a las terapias, por un lado son los elevados costos y por otro la disciplina por parte del paciente para cumplir cabalmente con el esquema de tratamiento. Este último punto es crucial para evitar el desarrollo de resistencia bacteriana, la recrudescencia de la infección y sobre todo, para alcanzar la resolución de la patología en cuestión, evitando así, la posibilidad de futuras complicaciones (Graham y Fischbach, 2010).

Hasta no contar con moléculas novedosas para tratar la infección o con una vacuna para prevenirla, las alternativas de tratamiento en la práctica clínica continuarán basándose en las terapias ya disponibles, y se sujetarán a cambios en los sesgos marcados por la resistencia frente a los antibióticos, acotándose cada vez más las opciones. Por lo que se requiere de una innovación terapéutica, que integre el empleo de coadyuvantes para disminuir los efectos secundarios de las terapias (irritación estomacal, vómito, diarrea, debilidad y alteraciones en el sentido del gusto, entre otras). Los productos naturales con actividad gastroprotectora o citoprotectora, podrían reducir algunos de los efectos secundarios y favorecer el cumplimiento de la terapia anti-*H. pylori* por parte del paciente. A pesar de que existen avances referentes a varios productos naturales con actividad gastroprotectora, las interacciones entre las terapias para erradicar a *H. pylori* y los productos naturales aún permanecen sin validación científica.

2.1.10.- ¿Cuándo es recomendable erradicar a *Helicobacter pylori*?

Se ha propuesto que la infección crónica por *H. pylori* podría ser benéfica, al limitar el desarrollo de otras patologías, lo cual sugiere que la bacteria es de hecho un anfibionte; una especie microbiana que funciona como patógeno o simbiote dependiendo del contexto específico (Blaser *et al.*, 2008).

No obstante la gran prevalencia de la infección por *H. pylori* se ha establecido que la bacteria no siempre debe ser eliminada. Bajo el marco de la conferencia Consenso de los Institutos Nacionales de Salud Estadounidenses, se consideró que los casos de individuos infectados sin manifestaciones clínicas detectables, son mayoritarios en relación con los que desarrollan alguna patología, por lo que se acordó erradicar a *H. pylori* sólo en casos de úlcera péptica (gástrica o duodenal) complicada o no, linfoma gástrico tipo M.A.L.T., en algunos casos de gastritis crónica activa y en pacientes con cáncer gástrico. (Malfertheiner *et al.*, 2012; Blaser, 1992, 1997, 1998, 1999).

2.2.- Gastritis y úlcera péptica; como problema de salud pública

La gastritis y la úlcera péptica son de las patologías más comunes del tracto digestivo superior que afectan a un gran porcentaje de la población mundial, con una acentuada morbilidad sobre la población adulta y de la tercera edad. Generan un fuerte impacto económico tanto en servicios de salud como en medicación. Sin dejar de lado que también constituyen una causa importante de mortalidad. Los dos factores más importantes que contribuyen al desarrollo de estas patologías son la infección por *H. pylori* y el uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINES), (Makola *et al.*, 2007).

En México, durante la última década, los casos de gastritis se han incrementado significativamente. Por lo que, a partir del 2003, se tomó la decisión de incluir a este padecimiento entre los nuevos casos bajo vigilancia epidemiológica y de registro obligatorio para instituciones públicas, ocupando el quinto lugar de frecuencia en este grupo de patologías (Armenta, 2005). El problema es más evidente cuando se correlacionan estas patologías con los elevados índices de infección por la bacteria *H. pylori* (Torres *et al.*, 1998) y el elevado consumo de AINES (Armenta, 2005).

Dentro de las patologías del tracto gastrointestinal, la úlcera péptica es una de las más relevantes debido a su incidencia a nivel mundial. Se estima que cerca del 20 % de la población mundial sufre de úlcera péptica en alguna etapa de su vida, lo que se ve reflejado en un impacto económico debido a su morbilidad y al costo de su tratamiento. Los factores que pueden predisponer la aparición de una úlcera péptica son muy variados, y van desde el estrés, la dieta, el consumo de tabaco y alcohol, hasta la administración de algunos fármacos (Bucciarelli y Skliar, 2007). Sin embargo, cerca del 80 % de los casos de úlcera péptica se asocian a la presencia de *H. pylori*. El 20 % restante está relacionado en su mayor parte con el consumo de AINES (Atherton, 2006).

La Secretaria de Salud de México y el sistema nacional de vigilancia epidemiológica, a través del sistema único de información, reportó para el 2010 que los casos de gastritis, úlcera péptica y duodenitis ocupaban el cuarto lugar dentro de las veinte principales causas de enfermedad. Para el año 2008, la incidencia por cada 100,000 habitantes de sexo femenino fue de 2,270 casos y para el masculino de 1,238 casos, con un comportamiento epidemiológico ascendente.

2.3.- Descripción de la gastritis y de la úlcera péptica

Cuando se genera un desequilibrio, entre los factores agresivos y de defensa de la mucosa gástrica, se presentan diversos trastornos que pueden afectar al estómago, al esófago o al duodeno, como son el reflujo gastroesofágico, la gastritis, la úlcera péptica y la duodenitis (Waldman y Terzic, 2010). La gastritis se refiere a una inflamación en la mucosa gástrica. Dependiendo de las características propias de la inflamación puede dividirse en gastritis aguda o crónica. La úlcera péptica se clasifica por su ubicación como gástrica o duodenal. Los intereses del presente trabajo de tesis se enfocan en la gastritis y la úlcera péptica. En el apéndice A se pueden consultar los aspectos básicos de anatomía, histología y fisiología del estómago.

2.3.1.- Gastritis aguda

La gastritis aguda es generada por procesos inflamatorios en la mucosa y submucosa gástrica, causada principalmente por la infección por *H. pylori*, o por antiinflamatorios no esteroideos (AINES), consumo excesivo de alcohol, tabaquismo, estrés, etc., y se resuelve en corto tiempo.

Cuando se adquiere la infección por *H. pylori*, la bacteria penetra a través de la capa de moco del estómago y se multiplica en la proximidad cercana a las células epiteliales superficiales (Dixon, 2001).

La colonización se inicia en el antro gástrico, debido a que en ese sitio no existen células parietales que secreten ácido (Innocenti, 2001; Gur *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1995). En esta fase inicial aguda de la infección existe una intensa proliferación bacteriana e inflamación gástrica aguda, que es detonada por los factores de virulencia de *H. pylori*, como son la proteína CagA y el LPS, que promueven el reclutamiento continuo de neutrófilos y la extravasación de líquido en la mucosa gástrica infectada. Adicionalmente, puede desarrollarse hipoclorhidria, y disminución de ácido ascórbico en el jugo gástrico.

2.3.2.- Gastritis crónica

La gastritis crónica es la inflamación del revestimiento del estómago, que se presenta gradualmente y persiste durante un tiempo prolongado. A diferencia de la gastritis aguda se caracteriza por el arribo de linfocitos y células plasmáticas a la mucosa, en respuesta a la alta producción de citocinas durante un periodo prolongado. Está asociada a la atrofia de la mucosa y metaplasia intestinal, pero sin provocar erosiones. Este tipo de gastritis puede ser provocada por infección crónica de *H. pylori*, consumo de alcohol, tabaquismo, etc. (Kumar, *et al.*, 2005).

La proliferación de linfocitos B y su posterior diferenciación en células plasmáticas producen la síntesis de inmunoglobulina M y anticuerpos, que amplifican la reacción inflamatoria.

Cuando *H. pylori* persiste, se da una segunda fase de defensa de linfocitos B con la producción de células plasmáticas en los folículos linfoides y la síntesis de inmunoglobulina A.

Si continúa la infección, el cuadro evoluciona a un nivel de daño mayor (Dixon, 2001), denominándose gastritis crónica atrófica. En este tipo de patología se observa adelgazamiento de la mucosa con disminución de glándulas y disfuncionalidad de las glándulas remanentes, infiltración linfocitaria y plasmocitaria, acompañada de neutrófilos, en todo el espesor de la *lamina propria*.

La alteración de la estructura y la pérdida del tejido glandular, provocan la ausencia de producción de moco y de sustancias elementales como enzimas y la hormona gastrina, componentes indispensables para mantener la funcionalidad de la mucosa (Dixon, 2001).

2.3.3.- Úlcera péptica

La úlcera péptica es una alteración en la integridad de la mucosa gastroduodenal. Se produce por un desequilibrio entre los mecanismos de defensa y los factores que pueden dañarla. Se caracteriza por una disrupción puntual e inflamación activa (Syam *et al.*, 2009), que genera una lesión benigna (5 mm) de la mucosa gástrica o duodenal, la cual se extiende desde la *muscularis mucosae* hasta la submucosa o zonas más profundas. Ocurre en algún sitio donde el epitelio de la mucosa se encuentra expuesto a algún agente dañino, como el ácido gástrico o la pepsina (Andrade *et al.*, 2007). Lo más común es que se encuentre en la curvatura menor del estómago, denominándose úlcera gástrica, o en el duodeno, denominándose úlcera duodenal (Kumar, *et al.*, 2005). También se produce daño vascular, que origina isquemia de la mucosa, disminución en el aporte de nutrientes y la formación de radicales libres, que como consecuencia, producen necrosis en el tejido y promueven una respuesta inflamatoria (Tarnawski, 2005). Dentro de las causas que originan a la úlcera péptica se encuentran la infección por *H. pylori* y la administración de AINES (Kumar, *et al.*, 2005).

Normalmente, *H. pylori* no coloniza el duodeno, sin embargo, se estima que del 10 al 15 % de las personas infectadas por la bacteria desarrollan úlcera duodenal, presentando una elevada liberación de gastrina en la mucosa antral, y como consecuencia, un incremento en la secreción de ácido. De manera adicional, la adherencia de *H. pylori* a las células epiteliales de la mucosa gástrica desencadena un cuadro inflamatorio crónico, que incrementa el recambio de las células epiteliales y la apoptosis (Waldman y Terzic, 2010; Logan, 2001).

La mayoría de los casos de úlceras duodenales ocurre entre los 20 y los 50 años de edad, mientras que, las úlceras gástricas se presentan en pacientes mayores de 40 años. Por otro lado, se estima que cerca del 90 % de las úlceras duodenales, y entre el 70 y el 90 % de las úlceras gástricas son generadas por una infección por *H. pylori* (Waldman y Terzic, 2010).

La administración de AINES, como son la aspirina o la indometacina, pueden inducir la formación de la úlcera al inhibir la síntesis de prostaglandinas. Dentro de los mecanismos de protección del tracto gastrointestinal, las prostaglandinas juegan un papel importante en el mantenimiento de la integridad de la microvasculatura de la mucosa, la regulación de la división celular y la secreción de moco y bicarbonato (Hayllar y Bjarnason, 1995). Por lo que al inhibir la síntesis de prostaglandinas mediante la administración de AINES, se disminuyen los factores protectores y se incrementa la susceptibilidad de la mucosa gástrica, para sufrir alguna lesión, dando lugar a la formación de la úlcera (Waldman y Terzic, 2010).

2.4.- Proceso resolutivo de la úlcera péptica

Bajo condiciones normales, el estómago dispone de una serie de mecanismos que lo protegen tanto de los factores agresivos endógenos (ácido gástrico, pepsina), como de los externos (sustancias irritantes, fármacos, etanol), evitando la formación de lesiones ulcerosas (Ham y Kauntz, 2007).

Se considera que la síntesis de prostaglandinas, en particular PGE₂, es uno de los mecanismos de gastroprotección más importantes, ya que incrementa la producción de moco y bicarbonato, además de promover el recambio epitelial de la mucosa gástrica (Hatazawa, 2007). El efecto de las prostaglandinas se relaciona estrechamente con el papel del óxido nítrico (NO), el cual se encarga de regular el flujo sanguíneo, estimular la síntesis de prostaglandinas y modular la liberación de moco gástrico (Matsuda, 1999).

Por otro lado, los donadores de grupos sulfhidrilo inhiben la adherencia de células inflamatorias al endotelio vascular, por lo que contribuyen a la resistencia de la mucosa gástrica y favorecen la vascularización, además de neutralizar a las especies reactivas de oxígeno, abatiendo el daño gástrico (Demir *et al.*, 2003).

La vascularización mayor del estómago es controlada por la despolarización de las células musculares vasculares, y mediada por la apertura de canales de potasio dependientes de ATP (Iwata *et al.*, 1997)

El proceso de resolución es controlado por la expresión de factores de crecimiento, inducidos por la respuesta inflamatoria al producirse una lesión en la mucosa gástrica, con el objetivo de regenerar el epitelio de la mucosa. La úlcera péptica es considerada una lesión inflamatoria, cuyo proceso de resolución involucra proliferación celular, interacciones entre células epiteliales y fibroblastos, angiogénesis, regeneración y remodelación tisular. El complicado y activo proceso de reconstrucción se da a través de la formación de tejido de granulación, el cual toma lugar en la base de la úlcera, de manera conjunta con el fenómeno de la angiogénesis y el restablecimiento de la arquitectura glandular. Proceso que se da durante las primeras 48–72 h, mientras que los otros procesos se activan gradualmente en un periodo de 2 a 14 días. (Luo *et al.*, 2004).

Las células del epitelio que circundan la base de la úlcera migran hacia esta zona y se posicionan en el tejido de granulación (conformado por células de tejido conectivo proliferante), protegiendo la lesión de los factores agresivos como la pepsina y el ácido gástrico (Luo *et al.*, 2008), dando paso a la formación de nuevos vasos sanguíneos que restaurarán la microcirculación de la mucosa, y por ende, el aporte de oxígeno y nutrientes. Posteriormente, el tejido de granulación es reemplazado por tejido conectivo para la formación de una cicatriz (Tarnawski, 2005).

Los defectos en el proceso de regeneración generan una cicatrización inadecuada, debido principalmente a la abundante producción de tejido conectivo, desorganización en la microvasculatura y al incremento en la permeabilidad de la mucosa gástrica, abatiendo los factores defensivos de la misma.

La administración de AINES, además de inducir la formación de la úlcera, también retarda la resolución de esta al disminuir la síntesis de prostaglandinas, también disminuye la proliferación celular, la angiogénesis y la maduración del tejido de granulación (Schmassmann, *et al.*, 1995). Mientras que la administración de algunos fármacos como los antiácidos pueden mejorar la calidad de la resolución de las úlceras (Tarnawski, 2005).

2.5.- Modelos experimentales para el estudio de la resolución de la úlcera gástrica (UG)

Es de gran importancia contar con modelos experimentales en los que se pueda estudiar la fisiopatogenia, que se presenta en los humanos, y la respuesta farmacológica en estudio, ya que este es el primer paso en la búsqueda de nuevos agentes que formen parte de un tratamiento para diversos padecimientos, en este caso, el tratamiento de la úlcera gástrica. Existen varios modelos experimentales de úlcera gástrica en animales, dentro de los más empleados y mejor caracterizados figuran los de inducción por etanol y por ácido acético.

2.5.1.- Modelo de úlcera gástrica inducida por etanol absoluto

El etanol es ampliamente utilizado para inducir la formación de úlceras en modelos experimentales con animales. Las lesiones inducidas por etanol están relacionadas con los cambios en el flujo sanguíneo de la mucosa gástrica. Altas concentraciones de etanol provocan una disminución en el flujo sanguíneo, al inducir la contracción venosa en la mucosa y una subsecuente dilatación arteriolar (Masuda, 1995). La administración de etanol actúa aumentando la síntesis de Leucotrieno TC₄, lo que provoca cambios en la microcirculación de la mucosa como son la estasis y la fuga plasmática (Peskar, 1986).

El daño inducido por el etanol está mediado en gran parte por la producción de radicales libres, con lo que se genera un considerable estrés oxidativo, siendo el radical hidroxilo uno de los agentes más importantes y el responsable de la patogénesis del daño generado en la mucosa gástrica (Mutoh, *et al.*, 1990). La administración de etanol también está relacionada con una reducción en la concentración de grupos sulfhidrilo no proteicos, lo que incrementa la susceptibilidad de la mucosa gástrica a ser lesionada (Loguercio, *et al.*, 1993).

2.5.2.- Modelo de úlcera gástrica inducida por ácido acético

Se trata de uno de los modelos de inducción de úlcera más utilizados por la comunidad científica. En este modelo se realiza una laparotomía y se inyecta ácido acético directamente en la submucosa de la porción glandular del estómago. Con este procedimiento se asegura la formación de úlceras consistentes en tamaño y severidad, además de que, tanto las características patológicas como el proceso de regeneración, se asemejen a las de la mucosa gástrica humana (Okabe y Amagase, 2005).

2.6.- Tratamientos de la úlcera péptica

El tratamiento para este padecimiento, básicamente consiste en controlar la secreción excesiva de ácido gástrico, incrementar la protección de la mucosa gástrica y erradicar a *H. pylori*, en caso de existir la infección. Durante el tratamiento se busca reducir el dolor, lograr la cicatrización de la lesión y evitar recaídas y complicaciones (Sweetman, 2006). Sin embargo, de acuerdo a la gravedad de la úlcera en los pacientes, como parte del tratamiento se puede llegar a requerir una cirugía (Feldman, *et al.*, 2002).

El tratamiento de la úlcera péptica se clasifica en dos grandes grupos: los que ayudan a incrementar los factores propios de defensa de la mucosa gástrica y los que contribuyen a reducir los factores agresivos, como la hipersecreción ácida. Dentro del primer grupo se encuentran los fármacos de recubrimiento, como el sucralfato y las sales de bismuto, la carbenoxolona y los análogos de las prostaglandinas. El segundo grupo incluye a los inhibidores de la bomba de protones, a los inhibidores de los receptores de histamina y los antiácidos.

Sucralfato: Su acción se debe a que, en presencia de ácido produce una capa viscosa que se adhiere a las proteínas de la superficie de la úlcera, favoreciendo su cicatrización. Inhibe la actividad péptica por absorción de pepsina y de sales biliares. Su efectividad en el tratamiento de la úlcera péptica se alcanza a dosis de 1 g antes de los alimentos (Villalobos, *et al.*, 2006).

Sales de bismuto: Forman un quelato con las proteínas que se encuentran en la superficie de la úlcera, protegiendo a la mucosa de la acción del ácido y estimulando la producción de moco. El nivel de cicatrización de la úlcera alcanza hasta un 80 %, tras 4 a 6 semanas de tratamiento. En casos donde la úlcera péptica se asocia a *H. pylori* tienen un efecto terapéutico cuando se administran con dos de los siguientes antibióticos: amoxicilina, tetraciclina, claritromicina, metronidazol, tinidazol (Villalobos, *et al.*, 2006).

Carbenoxolona: (Ácido (3 β)-3-[(3-carboxipropanoil)oxi]-11-oxoolean-12-en-30-oico). Es un derivado sintético del ácido glicirrízico, que tiene actividad antiulcerogénica tanto en modelos animales como en humanos, sin inhibir la secreción ácida gástrica y facilitando la cicatrización (Baron, 1977). Se ha reportado que la administración de carbenoxolona reduce la actividad péptica (Henman, 1970), incrementa la secreción de moco gástrico (Goodier, *et al.*, 1967), la producción de prostaglandinas (Takeuchi, *et al.*, 1998) y el flujo sanguíneo de la mucosa gástrica (Guslandi, 1994).

Análogos de prostaglandinas: Se considera que el mecanismo por el cual las prostaglandinas inhiben la secreción gástrica es a través de su acción sobre el sistema adenilciclasa/AMPCíclico. Reducen la acidez gástrica en un 80 % y también inhiben la producción de pepsina. La administración de 200 μ g de misoprostol media hora antes de los alimentos y al acostarse, ha demostrado su efectividad en el tratamiento de la úlcera duodenal, en una proporción de alrededor del 80 %. También se ha demostrado el efecto terapéutico del emprostil administrado media hora antes de los alimentos, con un índice de cicatrización del 80 % tras 6 semanas.

Inhibidores de la bomba de protones: Reducen la secreción de ácido gástrico, ya que inhiben de manera irreversible a la bomba de H⁺ y K⁺-ATPasa en la membrana de las células parietales, que son las enzimas responsables de la liberación de iones hidrógeno para la secreción de ácido gástrico. Al disminuir la acidez del estómago, los inhibidores de la bomba de protones también disminuyen la secreción de pepsina, con lo que se disminuye aún más la acción de los agentes agresivos sobre la mucosa gástrica. Los fármacos más representativos de este grupo son el

omeprazol, lanzoprazol y pantoprazol. Los niveles de cicatrización de la úlcera duodenal no complicada es hasta del 77% tras 2 semanas de tratamiento (Waldman y Terzic, 2010).

Inhibidores de los receptores de histamina (H₂): Actúan disminuyendo, tanto la producción basal de ácido gástrico como la producción del mismo estimulada por histamina, pentagastrina y por la ingesta de alimentos. Los antagonistas de los receptores de H₂ son análogos estructurales reversibles de la histamina, la cual es el principal agente regulador de la secreción de ácido gástrico. Por lo que al impedir la interacción de la histamina con su receptor en las células de la mucosa gástrica, se inhibe su secreción. Algunos ejemplos de fármacos antagonistas de los receptores H₂ son: la cimetidina, la ranitidina y la famotidina. Esta última proporciona el mejor efecto terapéutico. Los niveles de cicatrización varían del 75 al 90% tras 4 a 6 semanas de tratamiento (Villalobos, *et al.*, 2006, Waldman y Terzic, 2010).

Antiácidos: Son bases débiles que neutralizan al ácido clorhídrico, producido por las células parietales, formando sales como producto. Al neutralizar el pH gástrico reducen la actividad proteolítica de la pepsina, la cual actúa a pH 4-5. Tienen baja eficiencia en la resolución de la úlcera péptica. Se requiere de varias dosis durante un tiempo prolongado (hasta 6 semanas), dificultando el apego al tratamiento (Waldman y Terzic, 2010).

2.7.- Plantas medicinales y salud; una visión global

El empleo de plantas medicinales para el tratamiento de padecimientos de la salud, que van desde los leves hasta incluso algunos graves, se generaliza a todas las poblaciones del mundo. Un amplio sector de la población continúa recurriendo frecuentemente a la medicina tradicional, antes de consultar a un especialista de la salud. Es tan habitual esta práctica, que el uso y comercialización irracional de estas plantas, ha llegado a poner bajo amenaza a varias especies de las mismas o incluso a su extinción (Cragg *et al.*, 2005).

Uno de los objetivos de la investigación científica, sobre las propiedades medicinales de las plantas, es generar información básica de las especies con potencial farmacológico, para explotarlas de forma sustentable, y en el caso de ser factible, promover el desarrollo de fitomedicamentos (Cragg *et al.*, 2005).

El empleo de plantas, en los sistemas de medicina tradicional de muchas culturas, se ha documentado extensamente (Schultes *et al.*, 1990). Los sistemas basados en plantas continúan teniendo un papel esencial en el cuidado de la salud, tal es así, que la OMS ha estimado que aproximadamente el 80 % de la población mundial recurre principalmente a las medicinas tradicionales, para satisfacer las necesidades de salud más primordiales (OMS, 2002).

El desarrollo de los primeros fármacos, conocidos como tal tuvieron como fuente original a los productos naturales, en particular las plantas medicinales, las cuales son por excelencia la representación de la medicina tradicional y constituyen un recurso importante

para implementar nuevos planes de salud, combinando tanto el conocimiento popular como el científico (Newman y Cragg, 2012).

Los productos naturales han desempeñado un papel primordial para el desarrollo de fármacos (Newman y Cragg, 2012; Ji *et al.*, 2009; Harvey, 2008). Más del 50 % de los fármacos aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) en su momento fueron productos naturales o derivados de ellos (Kingston, 2011; Chin *et al.*, 2006).

Adicionalmente, varios productos naturales han demostrado tener especial selectividad frente a algunos blancos celulares. Los productos naturales biológicamente activos proveen ligandos selectivos contra blancos relacionados con ciertas patologías y desplazan las vías relacionadas con las mismas, de un estatus de enfermedad hacia el de la salud (Clardy y Walsh, 2004).

Los productos naturales constituyen una fuente importante de diversidad química estructural para el tratamiento de distintos padecimientos (Newman y Cragg, 2012). Actualmente, al menos 119 sustancias químicas, derivadas de 90 especies de plantas, son consideradas como fármacos importantes. De estos 119 fármacos, el 74 % fueron descubiertos como resultado de estudios químicos, dirigidos al aislamiento de sustancias activas, provenientes de plantas utilizadas en la medicina tradicional (Arvigo *et al.*, 1993).

El mercado global de las plantas medicinales en el 2006 alcanzó los 62 billones de dólares, con una tasa anual de crecimiento de entre el 5 y 15 %, según el Banco Mundial (Barquero, 2007). Las predicciones para el mercado mundial de los productos naturales, en el periodo del 2008 al 2013 comprenden un incremento de 19.5 a 32.9 billones de dólares, con una tasa de crecimiento anual del 11 % (Brinckmann, 2009). Además de los fármacos derivados de plantas, que comercializa la industria farmacéutica, existe un mercado de plantas medicinales en expansión, que se venden como suplementos dietarios o “medicinas naturales o tradicionales”. Si bien, en muchos países pobres de África y Asia las plantas medicinales son la única opción de tratamiento, en muchos países desarrollados se han convertido en una alternativa aceptada (Patwardhan, 2005).

2.8.- Contexto de las plantas medicinales en el México actual

La medicina tradicional y el empleo de plantas medicinales en nuestro país representan un vasto cúmulo de conocimiento empírico, que los pueblos indígenas nos han heredado, constituyéndose como una de las bases de nuestra afirmación cultural, por lo que se hace necesario reconocer todo su valor ante la sociedad, en un marco científico y legal adecuado a los tiempos modernos.

El consumo de plantas medicinales en México, con fines terapéuticos es muy común. De acuerdo a un inventario llevado a cabo por el Instituto Nacional Indigenista (INI) existen más de 3500 especies vegetales, de la flora mexicana, que poseen atributos medicinales y que son ampliamente utilizadas, por un gran sector de la población, para el tratamiento de diversos padecimientos. Sin embargo, solo a algunas de ellas se les ha realizado una valoración farmacológica (Argueta *et al.*, 1994).

A partir del empleo de plantas con fines terapéuticos se generaron remedios herbolarios, que posteriormente dieron lugar al diseño de algunos fitomedicamentos. El desarrollo de este tipo de medicamentos, en las últimas décadas, ha sido un tema de importancia global, tal es así, que la Ley General de Salud de nuestro país reconoce desde el 7 de mayo de 1997 la existencia de medicamentos y remedios herbolarios. El artículo 224 Fracción B III, cita como medicamentos de naturaleza herbolaria a los productos elaborados con material vegetal o algún derivado de éste, cuyo ingrediente principal es la parte aérea o subterránea de una planta, extractos, tinturas, así como jugos, resinas, aceites grasos y esenciales presentados en forma farmacéutica, cuya eficacia terapéutica y seguridad ha sido confirmada científicamente en la literatura nacional o internacional. Sin embargo, es necesario establecer una estandarización y un control de calidad eficaz y confiable, que garantice la continuidad de las propiedades fitoquímicas y farmacológicas de tales medicamentos (Pellevé, 1993).

Actualmente, un alto porcentaje de la población mexicana recurre al empleo de plantas medicinales, como una alternativa a los altos costos de los medicamentos alópatas. De ahí que resulte imperiosa la necesidad de realizar estudios científicos de estas plantas medicinales, en aras de garantizar la certeza de sus propiedades terapéuticas y la seguridad en su consumo, tomando en cuenta, que el porcentaje de los estudios profundos sobre la actividad farmacológica de plantas medicinales es relativamente escaso, comparado con la gran diversidad de especies que son empleadas con fines terapéuticos.

2.9.- Las plantas medicinales como fuente de fármacos

La característica que posiciona a las plantas, como fuente potencial de fármacos, es el gran número de moléculas, diversas y complejas que éstas producen con la finalidad de brindarse protección frente a depredadores y adaptarse al ambiente. Estas moléculas tienen una distribución restringida en el reino de las plantas, a tal punto, que algunas son privativas de sólo una especie o un grupo de ellas, por lo que, muchas veces se utilizan en botánica sistemática. Tales moléculas se denominan metabolitos secundarios (Jiangyong *et al.*, 2013; Newman y Cragg, 2012; Rao, 2002; Collin, 2001; Osbourn, 1996).

Los metabolitos secundarios se definen como sustancias que, generalmente no participan directamente en las funciones vitales de la planta, sino que intervienen en la mediación de interacciones fisiológicas, como por ejemplo en la defensa contra patógenos y organismos herbívoros (Nugroho y Verpoorte, 2002). Estos metabolitos son de estructura diversa y tienen una variada distribución dentro de la planta. Se conocen aproximadamente 155,000 metabolitos secundarios de plantas y hongos, entre los que se pueden citar: fenoles, alcaloides, terpenos, ligninas, taninos, etc. (Jiangyong *et al.*, 2013; Harbone, 1988; Edwards y Wratten, 1980; Ruberté y Martín, 1975).

En la actualidad, estos metabolitos corresponden a valiosos compuestos, que ejercen actividades biológicas de diversas aplicaciones, para el tratamiento de padecimientos que aquejan a la sociedad y que son utilizados como productos farmacéuticos (Rao, 2002). Estimaciones recientes han establecido que en los países occidentales, donde la química es la base de la industria farmacéutica, el 25% de las moléculas utilizadas son de origen natural vegetal (Jiangyong *et al.*, 2013; Graham, 2002).

2.10.- Plantas medicinales empleadas en el tratamiento de gastritis y úlcera gástrica

En la actualidad, existe una gran cantidad de plantas de uso popular para el tratamiento de la gastritis y de la úlcera péptica. Cabe mencionar, que generalmente su uso no es de manera individual, sino que se emplean de manera conjunta formando mezclas.

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

En nuestro país, se estima que del total de plantas que se emplean y que constituyen su gran cultura herbolaria, solo el 30 % poseen propiedades para el tratamiento de padecimientos gastrointestinales (Argueta *et al.*, 1994) y, de manera particular, se tiene registro de más de 56 plantas identificadas, para tratar la gastritis y la úlcera péptica (Navarrete *et al.*, 2002), que son de los padecimientos más recurrentes entre la población. Aunque su consumo es muy generalizado, sólo algunas de éstas han sido sujetas a estudios farmacológicos profundos, a saber: el Cuachalalate; *Amphipterygium adstringens* (Navarrete *et al.*, 1998), el Axihuitl; *Eupatorium aschembornianum* (Navarrete *et al.*, 1989), la sábila; *Aloe vera* (Parmar *et al.*, 1986), la Cancerina; *Hippocratea excelsa* (Navarrete *et al.*, 1992) y el Huilocuahuitl; *Agave monticola* (Navarrete *et al.*, 1992). Sin embargo, a sólo unas cuantas de ellas se les han identificado los metabolitos responsables de su actividad gastroprotectora como es el caso de *Amphipterygium adstringens* e *Hippocratea excelsa* (Navarrete *et al.*, 2002). El enfoque de estos estudios solo contempla la actividad gastroprotectora de estas plantas, sin tomar en cuenta su actividad anti-*H. pylori*.

2.11.- Las plantas medicinales como fuente de terapias anti-*Helicobacter pylori*

La necesidad de generar nuevas terapias anti-*H. pylori*, para el tratamiento de las enfermedades asociadas a la bacteria, sigue vigente y ha generado el interés por explorar el potencial de las plantas medicinales como una posible alternativa frente a las terapias actuales, o bien, para integrarlas como agentes coadyuvantes en las mismas.

A raíz del establecimiento de la relación entre *H. pylori* con la gastritis y la úlcera péptica, se dio un cambio radical en el enfoque de los estudios referentes a plantas medicinales, reportadas etnomedicamente, para este tipo de padecimientos. Tal es así, que los nuevos reportes abordan tanto el potencial gastroprotector, como el anti-*H. pylori* de las plantas, encontrándose muchas veces actividad inhibitoria sobre el crecimiento de la bacteria.

La búsqueda de propiedades anti-*H. pylori* en las plantas es reciente. El primer reporte que se tiene es de Cassel-Beraud y colaboradores en 1991, y es a partir de entonces que este tipo de estudios ha aumentado considerablemente.

A nivel mundial se ha estudiado el efecto anti- *H. pylori* de varias plantas, tanto de uso medicinal como comestible, y de las cuales a un gran porcentaje (aprox. 62 %) se les ha encontrado un efecto directo sobre la bacteria (Castillo-Juárez y Romero, 2007). Pero en México, no obstante su vasta cultura herbolaria y el gran número de plantas con propiedades medicinales, hasta el año 2005 no se tenía registro de investigaciones referentes al tema realizadas por investigadores mexicanos.

Nuestro grupo de trabajo ha contribuido de manera importante a este respecto, de manera que, para el año 2013 se ha analizado el potencial anti-*H. pylori* de alrededor de 55 plantas de uso tradicional mexicano (Escobedo-Hinojosa *et al.*, 2012; Castillo-Juárez *et al.*, 2009; Castillo-Juárez *et al.*, 2007; Castillo-Juárez y Romero, 2007).

Se plantea que los mecanismos por los cuales las plantas con actividad anti-*H. pylori* tienen su efecto, podrían ser cuatro: Actividad preventiva, plantas que se consumen frecuentemente en la dieta diaria y que posiblemente inhiban la adhesión de *H. pylori* a las células epiteliales del estómago, evitando la colonización de la mucosa por la bacteria y la posterior infección persistente (Lee *et al.*, 2006; Nakagawa *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2005; O'Mahony *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2004; Lengsfeld *et al.*, 2004; Shmuelly *et al.*, 2004; Bergonzelli *et al.*, 2003; López-Carrillo *et al.*, 2003; Yee *et al.*, 2002; Burger *et al.*, 2002; Burger *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 1997; López-Carrillo y Fernández-Ortega 1995). Actividad atenuante, probable mecanismo de acción de las plantas usadas tradicionalmente con actividad anti-*H. pylori*, mediante la disminución o el retraso del crecimiento bacteriano, alterando su tasa normal de proliferación. Este efecto se ha observado a nivel de extractos (Miyazawa *et al.*, 2006; Murakami *et al.*, 2005; Otsuka *et al.*, 2005; Annuk *et al.*, 1999). Actividad protectora, Muchos extractos y compuestos son capaces de atenuar el daño causado por la infección, al disminuir la inflamación y el daño a la mucosa. Se ha reportado que disminuyen el infiltrado de neutrófilos, atenúan la expresión o la secreción de IL-8, reducen el daño al ADN, inhiben la muerte celular apoptótica y favorecen la proliferación epitelial. (Murakami *et al.*, 2005; Otsuka *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2004; Tominaga *et al.*, 2002; Takagi *et al.*, 2000). Actividad inhibitoria del crecimiento, diversos agentes derivados de plantas presentan este tipo de actividad inhibitoria *in vitro*, sin embargo, su actividad *in vivo* no ha sido evaluada (Castillo-Juárez *et al.*, 2007). No obstante, los compuestos puros tienen un gran potencial para ser incluidos en la terapia, en combinación con otros agentes derivados de plantas o antibióticos comerciales (Kawase y Motohashi, 2004).

2.12.- Generalidades de *Cyrtocarpa procera*

El género *Cyrtocarpa* se encuentra en la familia Anacardiaceae, y está integrado por sólo cinco especies, que son: *C. procera*, *C. edulis*, *C. kruseana*, *C. caatingae* y *C. veluntifolia*. Las tres primeras se ubican en México y las dos últimas en Sudamerica (Fonseca, 2005). De las 5 especies, solamente *C. procera* cuenta con estudios sobre su actividad farmacológica.

Cyrtocarpa procera Kunth (Anacardiaceae), comúnmente conocida como “chupandilla” es una especie endémica de México, que se distribuye principalmente en zonas de selva baja caducifolia (figura 3 A).

La corteza de *C. procera* (figura 3 A y B) se emplea etnomédicamente, en forma de decocción, como agua de uso, para el tratamiento de padecimientos gastrointestinales, entre los que figuran la gastritis y la úlcera péptica (Canales *et al.*, 2005; Argueta *et al.*, 1994).

Se tiene el registro del uso de esta planta medicinal, desde tiempos prehispánicos, el cual sigue vigente. Recientemente se ha reportado su uso como adulterante de una de las especies más sobrecomercializadas y valoradas en nuestro país *Amphipterygium adstringens* (Cuachalalate), la cual se emplea para el tratamiento de gastritis, úlcera péptica y cáncer gástrico (Hersch-Martínez, 1995; Argueta *et al.*, 1994).

La elección de la planta medicinal *C. procera*, como objeto de estudio para el presente trabajo, se realizó con base en el criterio etnomédico, que se apoya en la investigación de especies vegetales con el aval del uso tradicional, que se le da en diferentes regiones de México.

2.12.1.- Descripción botánica

Árbol de 6 m de altura o más; hojas deciduas, densamente pubescentes en ambas caras, con (5)6 a 8 pares de foliolos de 4 a 7.6 cm de largo, opuestos o alternados unos sobre otros, obtusos o agudos, raquis ligeramente alado; panículas de 6 cm de largo; pétalos blancos o rosas de 3 mm de longitud; fruto pubescente de 2 cm de largo, color amarillo cuando maduro; la semilla con una o dos celdas (Standley, 1920).

El árbol tiene corteza gris, algo rugosa y no exfoliante, sus últimas ramas son de consistencia dura, no se arrugan al secar, generalmente produce inflorescencias en ramas laterales cortas, rara vez en terminales, los frutos tienen endocarpo duro, de superficie casi lisa, los opérculos están perfectamente delimitados de tal manera que, al desprenderse, dejan una abertura de límites bien definidos, florece entre marzo y mayo, habita en lugares secos o semisecos (Fonseca, 2005).

2.12.2.- Taxonomía de *Cyrtocarpa procera*

Reino: Plantae
Phillum: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Sapindales
Familia: Anacardiaceae
Género: *Cyrtocarpa*
Epíteto específico: *procera*
Nombre científico: *Cyrtocarpa procera* Kunth
Autor del nombre: Kunth
Determinador: Dra. Rosa María Fonseca Juárez

2.12.3.- *Sinonimia popular*

Estado de México: chucum-pum;
Guerrero: coco de cerro, baricoca, copalcojote;
Jalisco: copaljojote, copalcocote, copal, copali;
Michoacán: chucumpuz, chupandía, popoaqua;
Morelos: chupandilla, berraco;
Nayarit: chocote, puei (cora);
Oaxaca: maxacocote, machocote, palo de chupandía;
Puebla: ciruelillo.

2.12.4.- *Hábitat*

Se distribuye en zonas de clima cálido, semicálido, semiseco y templado, entre los 600 y los 1100 msnm. Planta silvestre, asociada a bosques tropicales caducifolio y subcaducifolio, bosque espinoso, bosque mesófilo de montaña, bosques de encino y de pino.

2.12.5.- *Distribución geográfica*

Mitchell y Dally (1991), la ubican en los siguientes estados de la República Mexicana: Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Estado de México, Morelos, Guerrero, Puebla, Oaxaca. Maximino Martínez (1959) y Standley (1920), la reportan desde Jalisco a Puebla, Oaxaca y Guerrero. Fonseca (2005), reporta ejemplares en Durango, Guerrero, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Puebla y Oaxaca. (figura 2).



Figura 2. Distribución geográfica de *C. procera*. Las ★ indican los estados en donde se ubica.

2.12.6.- Antecedentes históricos

Francisco Hernández (siglo XVI), en Historia Natural de Nueva España, en el capítulo XLVIII “Del COPALXOCOTL o árbol gomoso que da ciruelas” describe a *C. procera* como:

-Árbol con hojas redondeadas, parecidas en la forma a los ciruelos de España, y fruto como manzanas pequeñas, muy dulce, muy astringente, y que destila una baba sumamente glutinosa; cura esta, untada, las fiebres, y se administra contra las disenterías y las diarreas. La madera es muy propia para obras de talla y mejor que las demás para esculpir las imágenes de los dioses, pues además de ser dócil para trabajarse, no se parte, ni se pudre, ni se deteriora fácilmente. Tiene la goma sabor a “copalquahuitl”, de donde toma el nombre. Nace en regiones cálidas, y principalmente en las “mechoacanenses”, donde suele dársele el nombre de “popoaqua”. Copalxocotl: de copal (li), incienso, y xocotl, ciruela. Ciruela del copal, o ciruela que huele a incienso-.

Maximino Martínez (1969), en “Las plantas medicinales de México” hace una revisión de la obra, de Francisco Ximénez, (Siglo XVII) “Los cuatro libros de la Naturaleza” donde menciona:

-El meollo de cuesco es suave al gusto y untándose con él, el cuerpo, es bueno para curar la lepra. Nace en Tlaquiltenango (Morelos), que es en el Marquesado-.

Así como también la de Francisco Hernández (Siglo XVI) “Historia Natural de Nueva España” que menciona:

-Vulgarmente se usan las almendras al interior para curar la lepra-.

Según Standley (1920):

La madera es suave y rojiza con un fuerte aroma y se emplea para elaborar recipientes, labrar pequeñas imágenes y otros artículos.

Las cabras gustan de comer sus hojas.

El fruto es comestible, amarillo, carnoso, resinoso y con sabor ácido.

En Jojutla; Morelos, el fruto se conoce como “berracos” y “chupandías”.

Las semillas se emplean para alimentar a los cerdos.

Localmente se usa tomada internamente para tratar la lepra.

La corteza se usa como sustituto de jabón.

2.12.7.- Uso medicinal

La baba del fruto untada se emplea para mitigar la fiebre, y se administra contra las disenterías y las diarreas.

La corteza es la parte de la planta que más se utiliza. Se usa comúnmente en el Estado de México para resolver trastornos del aparato digestivo, tales como gastritis, úlcera péptica, diarrea rebelde y disentería.

Preparada en cocimiento junto con cuachalalate (*A. adstringens*) se emplea para lavar heridas y llagas, y para lograr una cicatrización más rápida; administrada por vía oral, se usa para curar las úlceras y quitar el dolor de cintura en Nayarit.

En Michoacán se recomienda masticarla para curar el dolor de muelas y la tos. También se refiere útil para disminuir la fiebre y contra la lepra. Se le atribuyen propiedades afrodisíacas y astringentes.

Para el tratamiento de la diarrea o soltura: se cuece un puñito de la cáscara en 1 litro de agua y se toma como agua de uso, durante cuatro días o el tiempo necesario.

En Jojutla; Morelos, se toma la almendra de la semilla para tratar la lepra.

En Tlalquiltén; Morelos, la almendra de la semilla se unta para tratar la lepra.

2.12.8.- Antecedentes de estudios biológicos y fitoquímicos

Cyrtocarpa procera es una especie que ha sido poco estudiada. A nivel fitoquímico se ha reportado el aislamiento y la identificación del esteroide β -sitosterol, del triterpenoide α -amirina y los ácidos grasos 1,3-propil-dipentadecanoato, 3-hidroxi-propil-9-octadecenoato, pentadecilbenzeno, eicosilbenzeno, docosano, dotriacontano y 2, 6, 10-trimetiltetradecano (Rodríguez-López *et al.*, 2006).

En cuanto a estudios farmacológicos, Rodríguez-López *et al.*, (2003) reportan que el extracto, cloroformo:metanólico 1:1, no tiene efecto espasmolítico en un modelo de contracción de íleon de rata, mientras que, Rosas-Acevedo *et al.*, (2011) determinaron una mejor actividad gastroprotectora, para el extracto metanólico de corteza regenerada, en comparación con el de corteza virgen, en un modelo de úlcera aguda inducida por etanol en rata.

Con respecto a la actividad antibiótica, Canales *et al.*, (2005) reportan la actividad antibacteriana, de un extracto metanólico, frente a algunas bacterias Gram negativas (*Vibrio cholerae* y *Shigella boydii*) y Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Bacillus subtilis*). Mientras que, Rodríguez-López *et al.*, (2006), no obtuvieron actividad inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*.

Castillo-Juárez *et al.*, (2009) reportaron la actividad inhibitoria, del crecimiento de *H. pylori*, de los extractos acuoso y metanólico de *C. procera*.

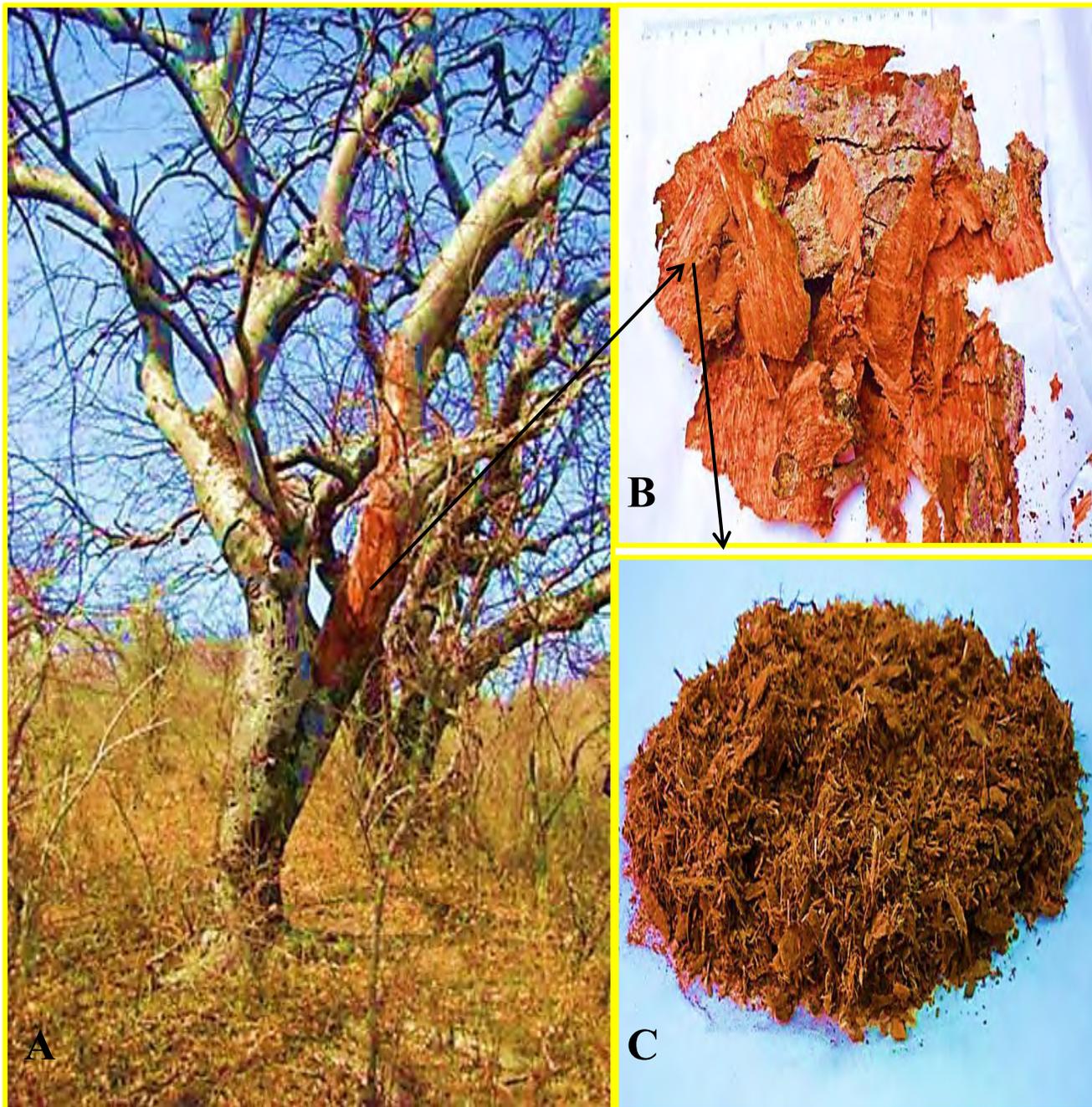


Figura 3. A (árbol) y B (corteza fresca), son imágenes tomadas durante la recolección de *C. procera* en marzo del 2010 (por Fonseca, Romero y Escobedo-Hinojosa). C, corteza de la recolecta una vez seca y molida manualmente.

3.- JUSTIFICACIÓN

Dentro de las causas que inciden sobre la tasa de éxito de las terapias anti-*H. pylori* se encuentran:

La resistencia creciente de la bacteria frente a los antibióticos empleados.

La falta de apego al tratamiento por parte del paciente, debido principalmente a que son terapias complejas y agresivas que producen efectos secundarios, lo que genera la recurrencia de la infección.

El alto costo del tratamiento.

Por lo anterior, continúa vigente la necesidad de encontrar:

Nuevos compuestos anti-*H. pylori* y

Terapias complementarias para el tratamiento de las enfermedades asociadas a la bacteria, que contrarresten los efectos secundarios y coadyuven a tolerar los tratamientos existentes y

Que sean más accesibles para la población.

4.- HIPÓTESIS

El antecedente etnomédico y los estudios de actividad gastroprotectora y anti-*H. pylori* previamente reportados, nos llevan a plantear y tratar de demostrar las siguientes hipótesis:

Cyrtocarpa procera:

- Posee actividad anti-*H. pylori*, gastroprotectora y antiinflamatoria.
- Favorece la resolución de patologías gástricas como la gastritis y la úlcera gástrica.
- Coadyuva en el tratamiento de la gastritis y la úlcera gástrica.

5.- OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo es determinar el potencial de la actividad anti-*H. pylori*, gastroprotectora y antiinflamatoria de *Cyrtocarpa procera*, para el tratamiento de las enfermedades asociadas a la bacteria.

Para lo cual, se planteó dividir el presente estudio en dos fases con los siguientes objetivos particulares:

Fase 1.- De *C. procera* obtener:

- Cuatro extractos de diferente polaridad:
 - hexánico (**H**),
 - diclorometánico (**D**),
 - diclorometánico-metanólico 1:1 (**D-M**) y
 - metanólico (**M**)

De **H**, **D**, **D-M** y **M** determinar:

- La actividad anti-*H. pylori*
- La toxicidad aguda.
- El efecto gastroprotector
- La actividad antiinflamatoria

Fase 2.- De los extractos que resulten activos de *C. procera*:

- Obtener cantidad considerable para su estudio.
- Determinar su mecanismo de acción con respecto a la actividad encontrada.
- Reducir su complejidad metabólica de manera biodirigida por la actividad encontrada.

6.- ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL

Para cubrir los objetivos correspondientes a la **FASE 1** (figura 4), se empleó la siguiente estrategia experimental correspondiente al estudio de los cuatro extractos **H**, **D**, **DM** y **M**, y así:

- Determinar la toxicidad aguda y evaluar:
 - la actividad anti-*H. pylori*,
 - gastroprotectora
 - antiinflamatoria

Con la finalidad determinar los límites de inocuidad de cada extracto e identificar a los más activos en cada una de las evaluaciones.

FASE 1 PARA H, D, DM y M

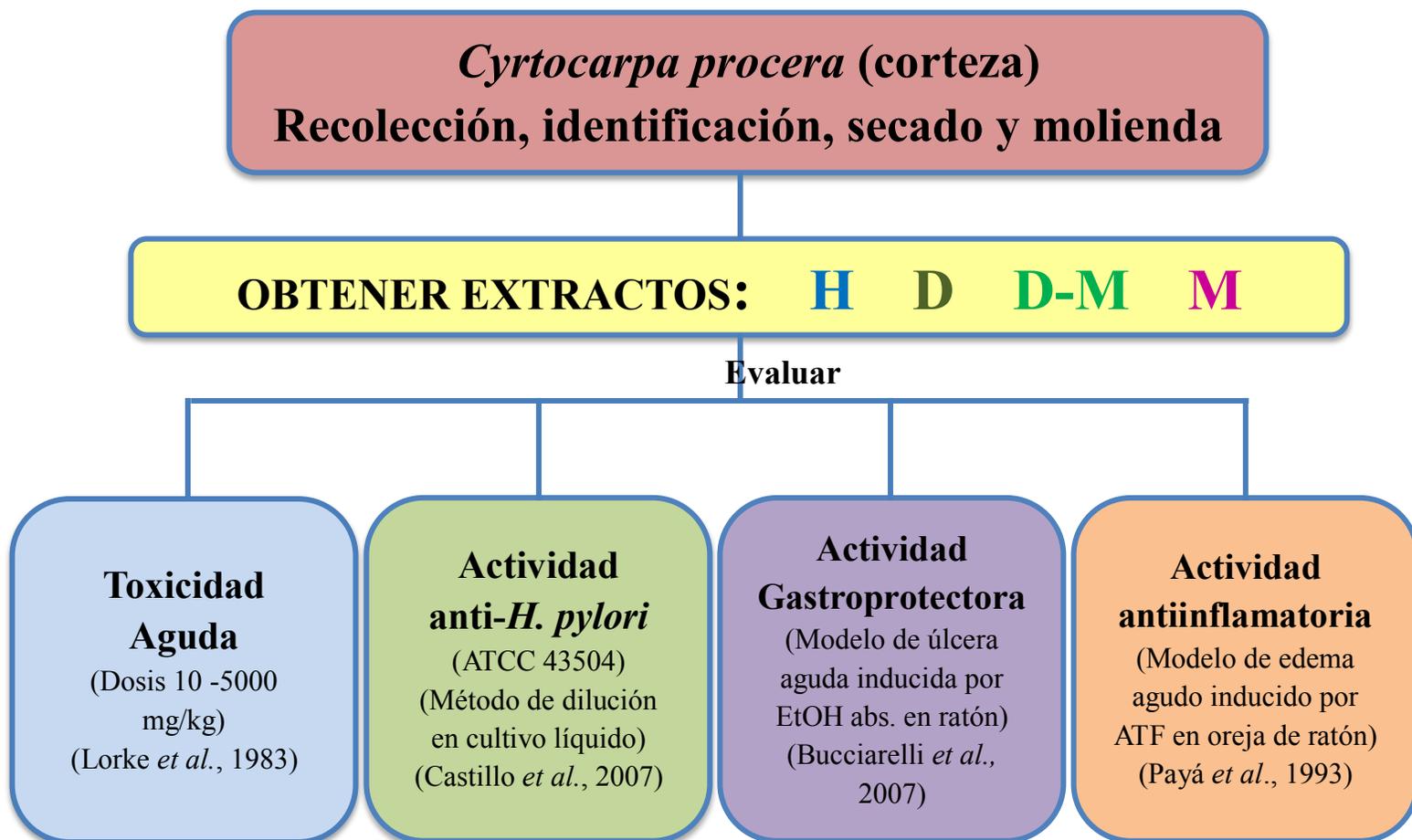


Figura 4. Estrategia experimental Fase 1. Empleada para el estudio de los cuatro extractos **H** (hexánico), **D** (diclorometánico), **DM** (diclorometano: metanólico 1:1) y **M** (metanólico).

Una vez identificado el extracto metanólico (**M**) como el de mejor actividad gastroprotectora, se empleó la siguiente estrategia experimental, conforme a lo establecido en los objetivos de la **FASE 2** (figura 5), para determinar su posible mecanismo de acción, toxicidad subaguda y efecto sobre la resolución de úlcera gástrica.

FASE 2 PARA **M**

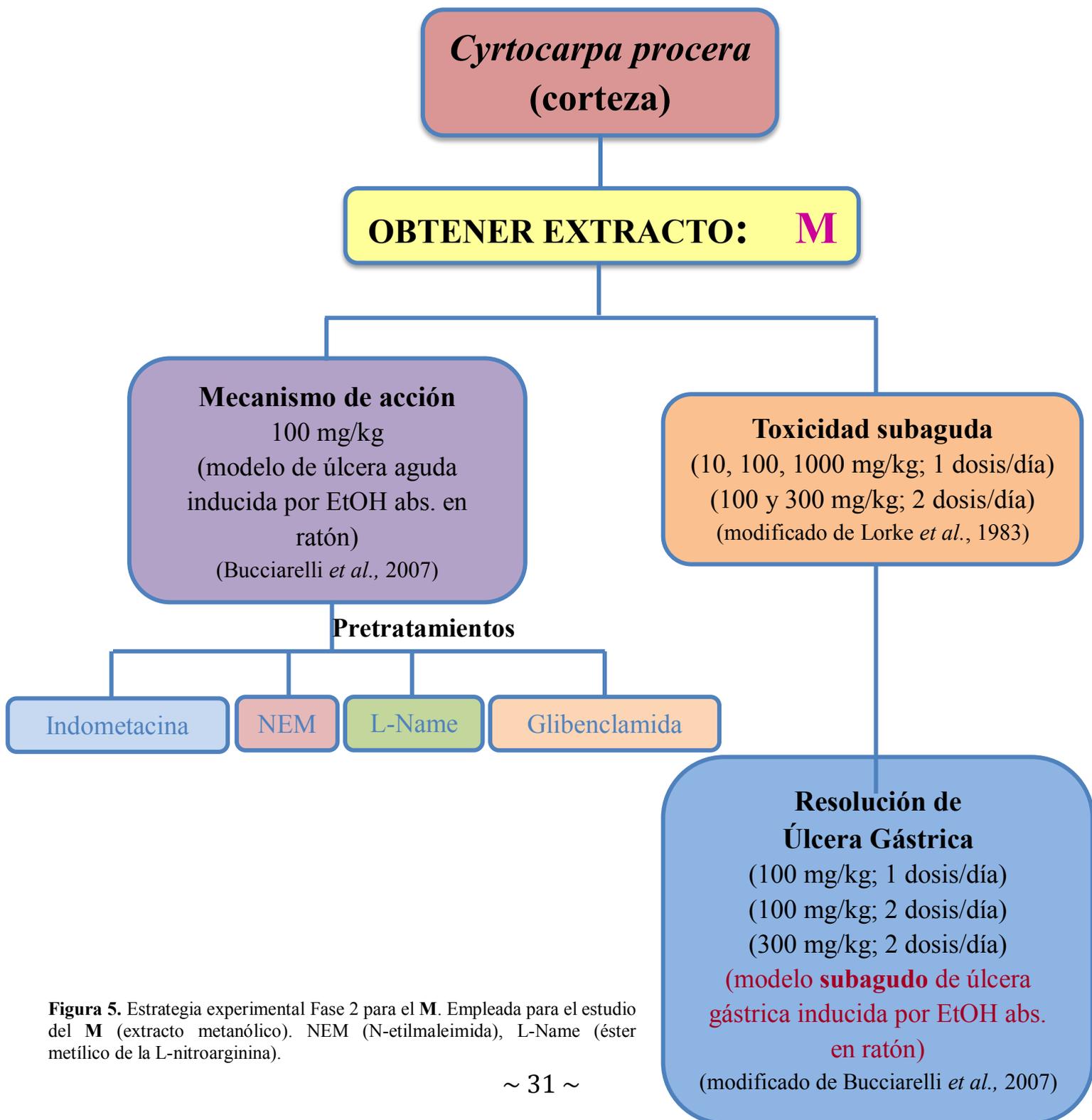


Figura 5. Estrategia experimental Fase 2 para el **M**. Empleada para el estudio del **M** (extracto metanólico). NEM (N-etilmaleimida), L-Name (éster metílico de la L-nitroarginina).

Una vez identificado el extracto hexánico como el más activo para inhibir el crecimiento de *H. pylori*, se empleó la siguiente estrategia experimental, conforme a lo establecido en los objetivos de la **FASE 2** (figura 6), para su fraccionamiento biodirigido por la actividad anti-*H. pylori*.

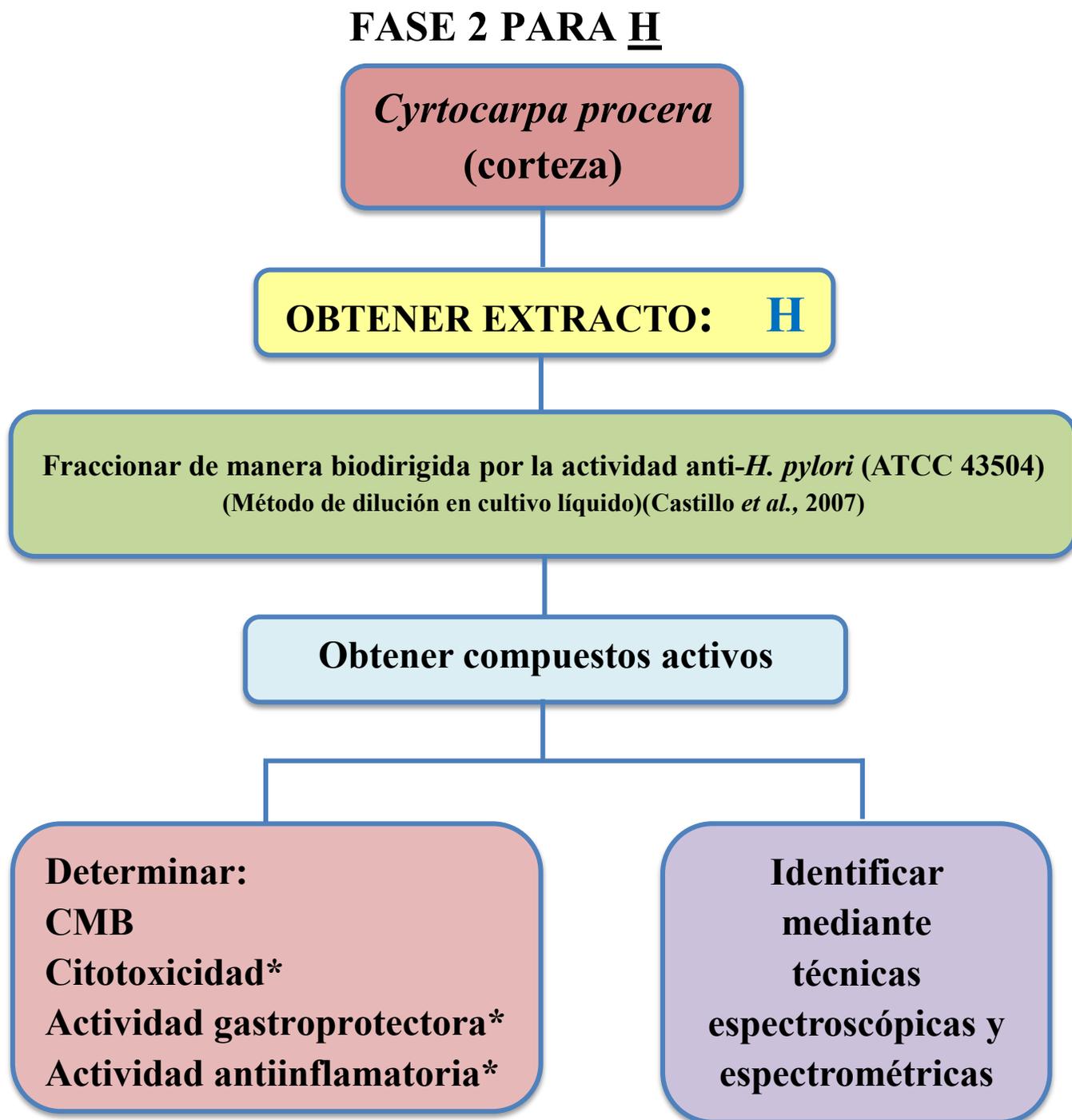


Figura 6. Estrategia experimental Fase 2 para el **H**. Empleada para el estudio del **H** (extracto hexánico). La evaluación de las actividades marcadas con * dependerá de la pureza del compuesto y de su rendimiento.

6.1.- Parte experimental fase 1 para H, D, DM y M

Comprende desde la recolección de la corteza de *C. procera*, la obtención de cuatro extractos de distinta polaridad, la evaluación de los mismos para determinar su inocuidad bajo administración aguda, y la determinación de su actividad anti-*H. pylori*, gastroprotectora y antiinflamatoria, con el objetivo de identificar a los extractos más activos.

6.1.1.- Recolección de *Cyrtocarpa procera*

La corteza fue recolectada en la localidad “el Higuerón,” del municipio de Jojutla; Morelos. Dos ejemplares del material vegetal recolectado fueron identificados por la Dra. Rosa María Fonseca Juárez y se depositaron en el herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM con los siguientes números de catálogo: 125630 y 125636. El material se secó a temperatura ambiente, a la sombra y fue molido manualmente.

6.1.2.- Preparación de los extractos H, D, DM y M

Los extractos se obtuvieron de manera individual, mediante maceración por 72 h, a partir de 100 g de corteza seca y molida, empleando un litro de los diferentes solventes: hexano, diclorometano, diclorometano-metanol (1:1) y metanol. La operación se repitió cinco veces y los extractos fueron concentrados *in vacuo* hasta sequedad para determinar su peso seco y rendimiento, denominándose en lo sucesivo como: hexánico (**H**), diclorometánico (**D**), diclorometánico-metanólico 1:1 (**D-M**) y metanólico (**M**).

6.1.3.- Animales de experimentación; cuidados y manejo

Los ratones empleados, a lo largo de todo el presente estudio, fueron provistos por el bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Ratones macho CD-1 de 20-25 g y 35-40 g se mantuvieron bajo condiciones ambientales estándar de laboratorio (22 ± 2 °C, ciclos de 12 h luz/oscuridad), y alimentados con dieta Rodent Lab Chow Purina y agua *ad libitum*. Todas las condiciones y procedimientos realizados con animales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la UNAM y en conformidad con la Norma Oficial Mexicana para el manejo y cuidado de animales (NOM-062-ZOO-1999), acorde con las regulaciones internacionales (NIH guidelines), para el cuidado y empleo de animales de laboratorio. Siempre procurando minimizar el sufrimiento de los individuos, así como la reducción del número de los animales empleados durante los experimentos.

6.1.4.- Fármacos, tratamientos y reactivos

Para evaluar la toxicidad aguda y la actividad gastroprotectora en el modelo de úlcera gástrica aguda inducida por etanol, por cuestiones de solubilidad, los extractos **H** y **D** se resuspendieron en Tween 80 al 10 % en solución salina isotónica (SSI), mientras que **D-M** y **M** sólo en SSI, para los cuatro casos se obtuvieron suspensiones homogéneas. Para el modelo de úlcera gástrica aguda se empleó carbenoxolona en SSI como fármaco de referencia. Todos los tratamientos administrados, vía intragástrica, fueron disueltos en un volumen de 10 mL/kg, independientemente de la concentración final. Para el caso del

modelo de toxicidad aguda el volumen administrado nunca excedió los 300 μL , y para el caso del modelo de úlcera gástrica los 400 μL , debido a que el volumen a ser administrado depende del peso de cada ratón. Para el modelo de edema agudo en oreja de ratón, se empleó 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (ATF) como agente flogístico, e indometacina y dexametasona como controles de referencia positivos. ATF, indometacina, **H** y **D** se disolvieron en acetona al 100 %, mientras que **D-M**, **M** y dexametasona fueron disueltos en acetona al 50 %. Los solventes fueron elegidos por la solubilidad de la muestra y sus características de volatilidad, sin que generaran efectos significativos en el ensayo (determinados experimental y estadísticamente, datos no mostrados). La carbenoxolona, indometacina y ATF empleados fueron adquiridos en Sigma-Aldrich y la dexametasona proviene del laboratorio farmacéutico CHINOIN.

6.1.5.- Evaluación de la toxicidad aguda de los extractos in vivo

La toxicidad de los extractos se evaluó empleando el protocolo de Lorke (1983). Este método permite determinar la dosis a la cual los extractos producen el 50 % de muertes en la población experimental, lo que se denomina: dosis letal media (LD_{50}).

El experimento consistió en administrar, a grupos de tres individuos, vía intragástrica y por única vez, diferentes dosis de los extractos: 10, 100, 1000, 1600, 2900 y 5000 mg/kg. Tras la administración, los animales se mantuvieron durante catorce días en observación, bajo condiciones ambientales estándar (22 ± 2 °C, ciclos de 12 h luz/oscuridad) con agua y alimento *ad libitum*, para monitorear cambios de peso y comportamiento con respecto al grupo control, al cual solo se le administró solución salina. Al final del experimento los animales fueron sacrificados en cámara de CO_2 y se realizó un examen macroscópico a los órganos para determinar alteraciones en los mismos.

6.1.6.- Evaluación in vitro de la actividad anti-*Helicobacter pylori* de los extractos

6.1.6.1.- Cepa bacteriana y condiciones de cultivo

Para los ensayos de actividad anti-*H. pylori* se empleó la cepa ATCC 43504, debido a su capacidad de crecer en caldos de cultivo libres de suero fetal bovino (SFB), sensibilidad a los antibióticos claritromicina y amoxicilina, y resistencia frente al metronidazol, las concentraciones mínimas inhibitorias reportadas en cada caso por el instituto de estándares clínicos y de laboratorio son: 0.015-0.120, 0.015-0.120 y 64-256 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Para crecer a la bacteria se emplearon cajas de agar Casman, suplementadas con 5 % de sangre desfibrinada de carnero y cuatro antibióticos (anfotericina 2 $\mu\text{g/mL}$, polimixina B 2.5 $\mu\text{g/mL}$, trimetoprima 5 $\mu\text{g/mL}$ y vancomicina 10 $\mu\text{g/mL}$), en una atmósfera microaerofílica (5 % O_2 y 10 % CO_2) a 37°C.

Cada lote bacteriano fue sometido a los siguientes controles de calidad: morfología en la tinción de Gram, pruebas bioquímicas (ureasa, catalasa y oxidasa) y la prueba molecular de amplificación de fragmentos de los genes *ureA* y *cagA* por PCR tiempo final. Los cultivos obtenidos se almacenaron a -70°C en caldo Brucella suplementado con 10 % de SFB (GIBCO BRL) y 10 % de glicerol.

6.1.6.2.- Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria

La actividad anti-*H. pylori*, de los extractos, se evaluó midiendo la inhibición del crecimiento de la bacteria, mediante el método de dilución en cultivo líquido (Castillo-Juárez *et al.*, 2007).

El ensayo consistió en crecer un cultivo de la bacteria en caldo Mueller Hinton suplementado con 0.2 % de ciclodextrina y cuatro antibióticos (anfotericina 2 µg/mL, polimixina B 2.5 µg/mL, trimetoprim 5 µg/mL y vancomicina 10 µg/mL), en una atmósfera microaerofílica (5 % O₂ y 10 % CO₂) a 37°C y 150 rpm hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento de la bacteria, lo que equivale a una absorbancia a 600 nm de 0.3 y ~10⁷ unidades formadoras de colonias (UFC), lo cual fue validado por el conteo de las UFC obtenidas mediante dilución en placa de cada uno de los cultivos experimentales.

Para iniciar el experimento se colocaron alícuotas del cultivo, de 1.5 mL en placas de 24 pozos, y se adicionaron 10 µL de las diferentes concentraciones de los extractos disueltos en dimetil sulfóxido (250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.81 y 3.6 µg/mL). Cada condición se ensayó por triplicado, las placas se incubaron durante 24 h bajo las condiciones anteriormente descritas, finalizando así el experimento. Los controles positivos de referencia empleados fueron: amoxicilina, metronidazol y claritromicina, mientras que el control negativo fue dimetil sulfóxido (0.66 % en la concentración final), el cual no tiene efecto alguno sobre el crecimiento de la bacteria. Se tomaron lecturas de absorbancia, tanto al inicio como al final del experimento.

Para determinar el porcentaje de inhibición se calculó el porcentaje de crecimiento de la bacteria, con respecto al control negativo, y posteriormente se determinó la CMI, que es la concentración mínima de los tratamientos a la cual se obtiene el 100 % de inhibición en el crecimiento del cultivo. Para validar los resultados del ensayo se realizaron tres replicas independientes.

6.1.7.- Evaluación de la actividad gastroprotectora de los extractos *in vivo*

El efecto gastroprotector de los extractos se determinó, empleando el modelo de úlcera aguda inducida por etanol absoluto en ratón, siguiendo la metodología descrita por Bucciarelli *et al.*, (2007). Se emplearon ratones macho CD1 de 30-35 g de peso, los cuales se mantuvieron bajo condiciones ambientales estándar (22 ± 2 °C, ciclos de 12 h luz/oscuridad), 24 h previas al ensayo se les privó de alimento permitiéndose el acceso de agua *ad libitum*.

Los ratones fueron distribuidos en grupos de seis individuos y la administración de los tratamientos se realizó vía intragástrica, siendo el grupo control negativo quien recibió el vehículo [Tween 80 al 10% en SSI o SSI], a una dosis de 10 mL/kg. El grupo control positivo de referencia fue tratado con carbenoxolona (50 mg/kg), mientras que los grupos experimentales recibieron el correspondiente extracto, a las diferentes dosis evaluadas (0.1-300 mg/kg). Después de 1 h, a todos los individuos se les administró etanol absoluto a una dosis de 7 mL/kg, transcurrida 1.5 h a partir de la administración del agente injuriente los

ratones se sacrificaron en cámara de CO₂. Los estómagos fueron extirpados e insuflados con 2 mL de solución salina y fijados en formol al 2 % durante 2 h.

Cada estómago se abrió por la curvatura mayor, se prensó entre dos placas de vidrio y se escaneó. El área de lesión se determinó con la ayuda del programa imageJ®, donde la suma de todas las lesiones, halladas en la región glandular del estómago, se denomina índice de úlcera (IU).

El porcentaje de gastroprotección se determinó empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ gastroprotección} = \frac{\text{IU (control negativo)} - \text{IU (tratamiento)}}{\text{IU (control negativo)}} \times 100$$

Los resultados obtenidos son el promedio de dos réplicas, los cuales fueron sometidos a una prueba de normalidad, posteriormente a un análisis de varianza y a una comparación múltiple de medias para aislar grupos con diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$).

6.1.8.- Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos in vivo

La determinación del efecto antiinflamatorio, de los extractos, se realizó bajo el modelo de edema agudo, inducido por el 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (ATF), en oreja de ratón, acorde a la metodología descrita por Payá (1993). Se emplearon ratones macho CD1 de 25-30 g de peso, el número de individuos por grupo experimental fue de 6.

El edema se indujo bajo anestesia general con pentobarbital sódico (3.5 mg/kg, IP), mediante la aplicación de 2.5 µg/oreja de ATF, las dosis ensayadas de los tratamientos fueron las siguientes: para los extractos de 0.5–3 mg/oreja, para los controles positivos de referencia 0.05 mg/oreja y 0.5 mg/oreja para dexametasona e indometacina, respectivamente. Como control negativo se administraron los vehículos: acetona o acetona 50 % (conforme a lo descrito en 6.1.4).

La aplicación, tanto del agente edematógeno, los tratamientos y los vehículos, fue mediante vía tópica. Inicialmente, a la oreja derecha se le aplicó la solución de ATF (10 µL) e inmediatamente después la solución de alguno de los tratamientos (20 µL), mientras que la oreja izquierda recibió volúmenes iguales, pero del vehículo correspondiente. Tras 6 h del experimento, los animales se sacrificaron en cámara de CO₂. Tanto al inicio, como al final del procedimiento se tomaron mediciones, en la parte distal de las orejas, con ayuda de un micrómetro digital para determinar el espesor del edema, también se obtuvieron biopsias de 7 mm, al final del experimento, para determinar el peso del edema.

El incremento del peso, o espesor, de la muestra derecha con respecto a la izquierda representa el edema. El porcentaje de inhibición, del edema, se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición del edema} = \frac{\text{EDEMA (control negativo)} - \text{EDEMA (tratamiento)}}{\text{EDEMA (control negativo)}} \times 100$$

Los resultados obtenidos son el promedio de dos replicas, los cuales fueron sometidos a una prueba de normalidad, posteriormente a un análisis de varianza y a una comparación múltiple de medias, para aislar grupos con diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$).

6.2.- Parte experimental fase 2 H y M

Los extractos más activos identificados durante la fase 1 fueron **H** y **M**. Considerando tanto la actividad encontrada como su rendimiento, para el **H** se llevó a cabo el fraccionamiento biodirigido por la actividad anti-*H.pylori*, mientras que para el **M** se continuó con el estudio de su mecanismo de acción gastroprotector y su efecto resolutivo. Las metodologías empleadas se describen a continuación.

6.2.1.- Obtención a mayor escala de los extractos H y M

La obtención de los extractos individuales **H** y **M** se realizó mediante el método de extracción exhaustiva por maceración. Para obtener **H** y **M** se emplearon 5.9 y 1.5 kg, respectivamente, de corteza seca y finamente molida. El proceso de extracción se llevó a cabo por maceración durante 72 h en 20 L de n-hexano para el **H** y en 8 L de metanol para el **M**, repitiendo la operación cinco veces con el mismo material vegetal. Los extractos fueron concentrados *in vacuo* hasta sequedad. El **H** obtenido se evaluó para determinar y corroborar su actividad anti-*H. pylori*, mientras que el **M** se evaluó para verificar su actividad gastroprotectora.

6.3.- Parte experimental Fase 2 para el H

6.3.1.- Fraccionamiento biodirigido por la actividad anti-*Helicobacter pylori* del H

Inicialmente, el **H** (42 g) se particionó mediante extracción líquido-líquido (Hx:MeOH 1:1), generando las fracciones primarias **Fx-Hx** y **Fx-MeOH**.

Posteriormente 36 g de **Fx-MeOH** fueron sometidos a cromatografía en columna abierta (CCA) en gel de sílice (720 g), empleando el siguiente gradiente de elución: Hx → Hx:Dm → Dm → Dm:MeOH (1:1). Este procedimiento permitió la obtención de diez fracciones secundarias (nomenclatura **I** → **X**).

De las cuales la fracción **V** (4.6 g) nuevamente fue sometida a CCA en gel de sílice (138 g), con el siguiente gradiente de elución: Hx → Hx:AcOEt → AcOEt → AcOEt:MeOH (1:1), generando seis fracciones terciarias (nomenclatura **V**₁ → **V**₆).

La fracción **V**₂, (3.93 g) se adsorbió en gel de sílice (6.0 g) y se purificó mediante CCA en gel de sílice (236 g). La elución de la columna se llevó a cabo inicialmente con Hx y con mezclas de Hx-AcOEt de polaridad creciente, lo que permitió la obtención de cinco fracciones principales (**F1** → **F5**).

La **F3** (1.73 g) se adsorbió en 3.0 g de gel de sílice y se purificó en CCA con 34.9 g de gel de sílice. La elución inicial se llevó a cabo con Hx y con cambios graduales de mezclas de Hx-AcOEt, obteniéndose cuatro fracciones principales (**F3.A** → **F3.D**).

La fracción **F3.B** (827.7 mg) fue purificada por CCA con de gel de sílice (1.24 g), la cual fue eluida con mezclas de Hx-AcOEt, y como resultado de la separación se obtuvieron cuatro subfracciones (**F3.B.1** → **F3.B.4**).

La subfracción **F3.B.3** (87.7 mg) se purificó en 3.5 g de gel de sílice mediante CCA obteniéndose un aceite incoloro, que en CCF corresponde al señalado en la fracción subsecuente (**F3.B.4**).

La subfracción **F3.B.4** (719.2 mg) fue purificada por CCA en 21.6 g de gel de sílice, la cual fue eluida con una mezcla de Hx-AcOEt 9:1 y como resultado se obtuvo un aceite incoloro (nomenclatura **MEZ**) que se analizó por RMN de ^1H .

La RMN se realizó en el Instituto de Química de la UNAM. Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C se llevaron a cabo a 25°C utilizando los espectrómetros: *Varian Inova 500* (a 500/125 MHz) y *Bruker* (400/100 MHz). Los espectros se obtuvieron en CDCl_3 y en DMSO como disolvente, utilizando tetrametilsilano (TMS) como estándar interno.

6.3.2.- Evaluación in vitro de la actividad anti-Helicobacter pylori del H

6.3.2.1.- Determinación de la concentración mínima bactericida del H

Para determinar el efecto del **H** sobre *H. pylori*, se evaluó su concentración mínima bactericida (CMB). El procedimiento consiste en cuantificar el número de bacterias viables, a lo largo del crecimiento de un cultivo, en presencia de diferentes concentraciones del extracto (fijadas a partir del valor de su CMI).

Para lo cual, se monitorea el crecimiento de *H. pylori* cada 2 h, durante al menos 24 h, mediante el método de dilución en placa, para poder analizar el comportamiento inhibitorio y determinar si la tendencia es bactericida o bacteriostática.

6.4.- Parte experimental Fase 2 para el M

6.4.1.- Evaluación de la actividad gastroprotectora del M para determinar su posible mecanismo de acción

Se siguió la misma metodología descrita, para la evaluación de la actividad gastroprotectora de los extractos *in vivo* (6.1.7), con las siguientes modificaciones:

30 min antes de dar el extracto, se administró alguno de los siguientes pretratamientos:

- a) Indometacina (10 mg/kg, en 5 mM NaHCO_3 en SSI, vía subcutánea) para evaluar el papel de las prostaglandinas endógenas,

- b) N-etilmaleimida (NEM) (1 mg/kg, en SSI, vía subcutánea) para evaluar el papel de los grupos sulfhidrilos,
- c) Éster metílico de la nitro-L-arginina (L-NAME) (10 mg/kg, en solución salina, vía intraperitoneal) para evaluar el papel del óxido nítrico endógeno,
- d) Glibenclamida (5 mg/kg, en SSI, vía intragástrica), para evaluar el papel de los canales de potasio dependientes de ATP.

Después de suministrar los pretratamientos, los tratamientos se administraron por vía intragástrica: SSI como control negativo, carbenoxolona 50 mg/kg como control positivo, ó 100 mg/kg del **M**. Se permitió 1 h de absorción y posteriormente se administró etanol absoluto (7 mL/kg) para inducir las lesiones ulcerosas en la mucosa gástrica. Tras 1.5 h, los ratones se sacrificaron en cámara de CO₂. El resto del protocolo se siguió tal cuál se describió en el punto 6.1.7. Los reactivos empleados en este apartado fueron adquiridos en Sigma-Aldrich.

6.4.2.- Evaluación de la toxicidad subaguda del M

La determinación de la toxicidad subaguda se realizó usando como base el modelo de Lorke en ratones, con modificaciones y en dos modalidades: en el experimento **I**), se les administró una dosis del **M** por día durante 20 días (10, 100 o 1000 mg/kg-ratón), en el **II**) se les administraron dos dosis por día de 100 ó 300 mg/kg-ratón durante 20 días.

Las variables registradas diariamente fueron: cambios en el peso corporal, alteraciones conductuales y de la consistencia general de las excreciones (fecales, urinarias, mucosas) con respecto a los controles negativos.

Tras el último día de administración, cinco ratones de cada grupo fueron anestesiados en cámara de CO₂ y sacrificados mediante punción cardiaca, a la sangre obtenida se le realizó hemograma y bioquímica sanguínea. También se realizaron observaciones de la morfología macroscópica de los diferentes órganos y se registraron los pesos de cada uno de los mismos.

Porciones representativas de los órganos fueron fijadas en formol amortiguado y procesados mediante técnicas histológicas para el análisis histopatológico. Los cinco individuos restantes de cada grupo se sacrificaron 15 días posteriores al último día de la administración, siguiendo el mismo protocolo anteriormente descrito.

6.4.3.- Evaluación del efecto resolutivo de úlcera gástrica del M

Una vez descartada la toxicidad subaguda, se realizó la evaluación del efecto resolutivo de la **UG** sobre el **M**, para lo cual, se indujo la **UG** a los ratones mediante la administración intragástrica de 7 mL/kg de etanol absoluto, y posteriormente se les administró el **M** por 20 días en dos modalidades: **A**) una dosis de 100 mg/kg-día y **B**) dos dosis de 100 o 300 mg/kg-día.

Para evaluar la resolución de la UG, mediada por el M, se sacrificaron 6-10 individuos de cada grupo al 5°, 10°, 15° y 20° día de administración, y se llevó a cabo el análisis macroscópico, histopatológico e histoquímico de los estómagos a lo largo del ensayo. Al igual que para el ensayo de toxicidad subaguda, las variables registradas diariamente fueron cambios en el peso corporal, alteraciones conductuales y de las excreciones con respecto a los controles negativos

6.5.- Técnicas histológicas e histoquímicas

La técnica histológica se refiere a la serie de pasos que conducen a la elaboración de laminillas o preparaciones histológicas. Este proceso lleva a la obtención de cortes de órganos preparados, adecuadamente, para poder efectuar el estudio microscópico de sus componentes: tejidos y células (Putt, 1972; Pearse, 1978). Los tejidos, que se sometieron a la técnica histológica, fueron los estómagos de los ratones de la evaluación de gastroprotección y resolución de úlcera gástrica, y los siguientes órganos de los ratones del ensayo de toxicidad subaguda: hígado, riñones, bazo, intestino delgado, colon y estómago. Para lo cual, inicialmente, fueron fijados en formalina al 10 % amortiguada. La técnica histológica se realizó en el Laboratorio de Histología del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina UNAM, en donde se llevó a cabo el tren de deshidratación y los procesos de infiltración e inclusión en parafina. Se realizaron cortes sagitales en micrótopo, de un espesor de 5 μm , y posteriormente las tinciones histológicas o histoquímicas, dependiendo del caso.

6.5.1.- Análisis histopatológico de tejidos

Las variables histopatológicas analizadas para los tejidos, obtenidos de los ensayos de gastroprotección y de resolución de úlcera gástrica, fueron: integridad hística (disrupción del epitelio de la mucosa gástrica), infiltrado eritrocitario e inflamatorio, ácido peryódico de Schiff (APS) positividad (presencia de fucsia intenso que denota presencia de moco neutro), Azul alciano (AA) positividad (presencia de color azul que denota presencia de moco ácido). Para el caso de los tejidos, de los ensayos de toxicidad subaguda, se realizó un análisis general comparativo sobre tinción de hematoxilina-eosina (H-E), entre los grupos control y los experimentales para detectar alteraciones.

6.6.- Modelos estadísticos

Los ensayos, para determinar la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida, se realizaron por triplicado con al menos tres réplicas independientes, de las cuales se calculó el promedio y el error estándar de la media. Por otro lado, para los ensayos *in vivo* (gastroprotección, antiinflamatorio y resolución de úlcera gástrica), se emplearon seis o más individuos por ensayo y se realizaron al menos dos réplicas independientes. Los valores se reportan como el promedio \pm el error estándar de la media. Se llevó a cabo un análisis estadístico de varianza de una vía (Kruskal-Wallis o ANOVA), seguido de una comparación múltiple de medias de Duncan o de Tukey, para identificar grupos con diferencias estadísticas.

7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1.- Fase 1 resultados referentes a los cuatro extractos H, D, DM Y M:

7.1.1.- Extractos de *Cyrtocarpa procera*

Con el objetivo de adquirir la mayor información posible acerca de los compuestos contenidos en la corteza de *C. procera* se obtuvieron cuatro extractos, de distinta polaridad, teniendo en cuenta que en ocasiones es posible obtener perfiles metabólicos, bien diferenciados, gracias a las características de polaridad de los solventes. Los extractos de mayor rendimiento fueron los de mayor polaridad (**M** =13.2 % y **D-M**=12.8 %), mientras que los de menor polaridad generaron rendimientos muy bajos (**D**=1.07 % y **H**=0.9 %). Analizando, los perfiles cromatográficos de los extractos, se observa que el **M** y el **D-M** comparten una amplia región de similitud, sin embargo, en el **D-M** se observa un mayor enriquecimiento de compuestos en la zona de mediana a baja polaridad. Por otro lado, el **H** y el **D** también comparten una gran región del perfil, sin embargo, el **D** contiene una gran variedad de pigmentos, mientras que el **H** contiene una mayor concentración de compuestos muy apolares, como se observa en la figura 7.

Fase móvil: 50 Hx: 30 AcoEt: 19 MeOH: 1 Ácido acético glacial

Sulfato cérico amoniacal

$\lambda = 254 \text{ nm}$

$\lambda = 365 \text{ nm}$

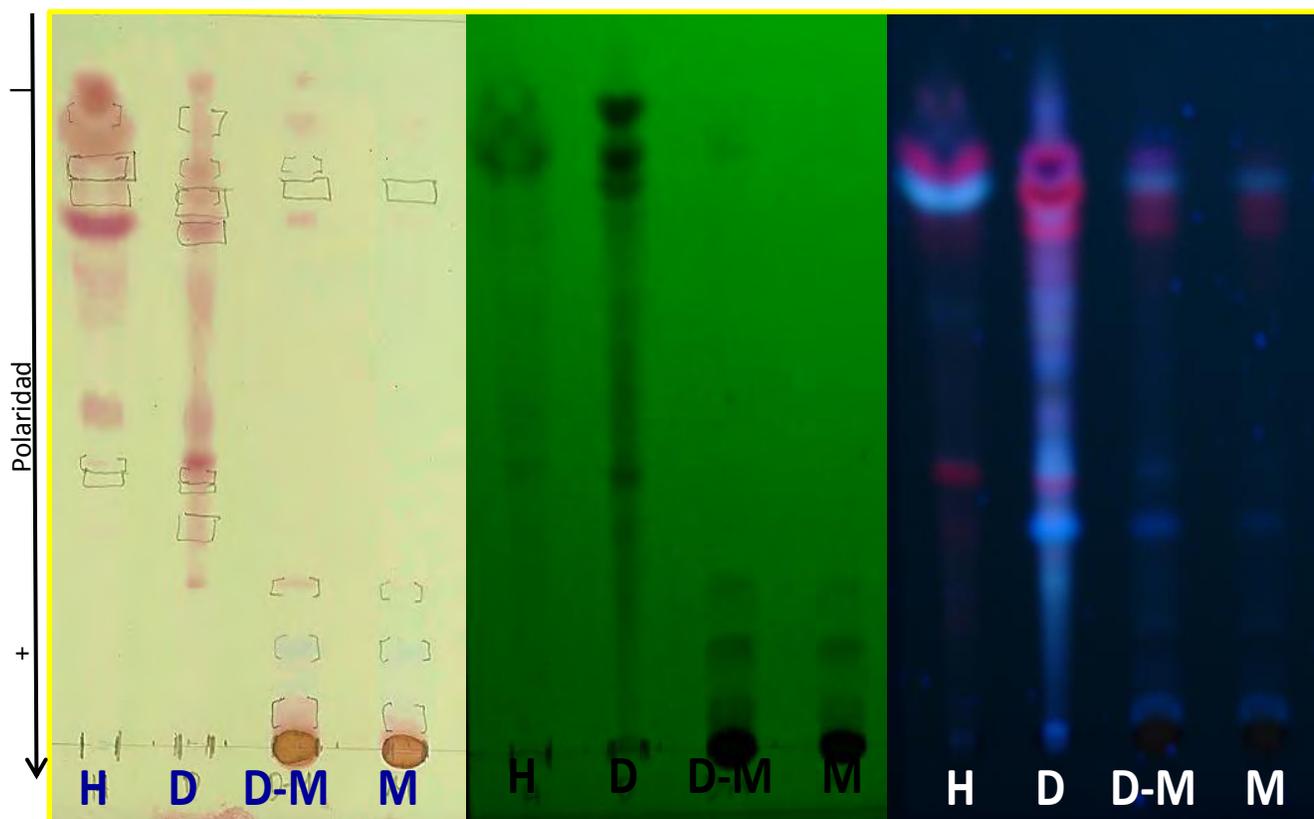


Figura 7. Perfiles cromatográficos de los cuatro extractos obtenidos de la corteza de *C. procera*.

7.1.2.- Evaluación *in vitro* de la actividad anti-*H. pylori* de los extractos

La determinación, de la actividad anti-*H. pylori*, se realizó por el método de dilución en cultivo líquido. Los cuatro extractos presentaron buena actividad, con una concentración mínima inhibitoria (CMI) (**H**= 7.8, **D**= 15.6, **D-M**= 62.5, **M**=62.5, $\mu\text{g/mL}$), menor a la del metronidazol (MIC= 250 $\mu\text{g/mL}$), uno de los fármacos de referencia más empleados contra *H. pylori*, destacándose notablemente la actividad del **H** (Figura 8).

El hecho de que los cuatro extractos mostraran actividades sobresalientes, contra *H. pylori*, sugiere que compuestos estructuralmente diferentes pueden ser los responsables de la actividad. Sin embargo, el valor de CMI del **H**, es indicativo de que esta fracción contiene las sustancias más activas, o bien a mayor concentración.

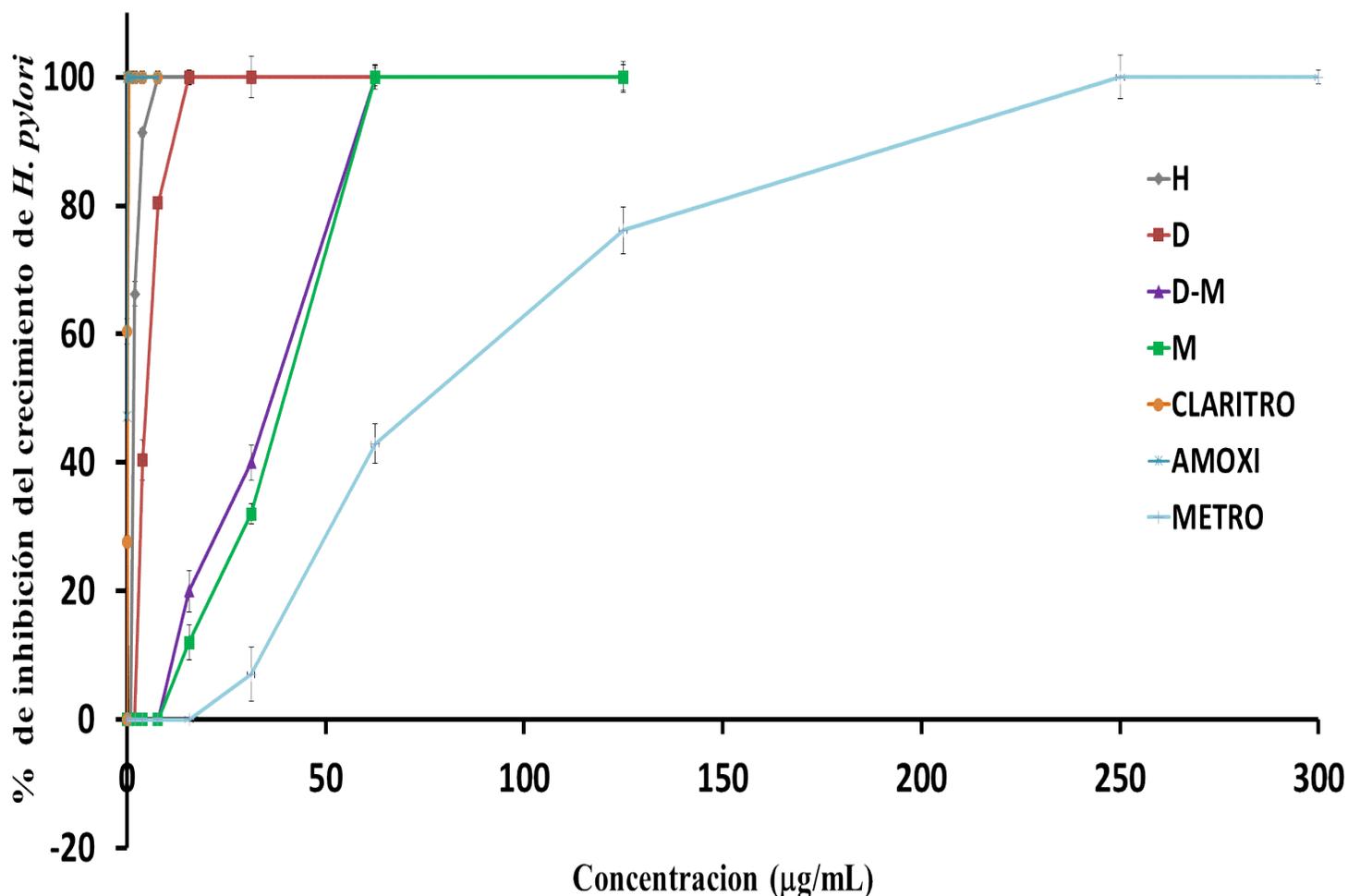


Figura 8. Actividad anti-*H. pylori* de los cuatro extractos de *C. procera* y de los antibióticos de referencia. (**H**= extracto hexánico, **D**= extracto diclorometánico, **DM**= extracto diclorometano-metanol 1:1, **M**= extracto metanólico, METRO= metronidazol, AMOXI= amoxicilina, CLARITRO= claritromicina), cada curva representa el promedio de tres réplicas independientes por triplicado.

El efecto de cada uno de los cuatro extractos, sobre el crecimiento de *H. pylori*, se muestra en la figura 8. Como puede observarse, la efectividad inhibitoria de todos supera por mucho a la del metronidazol, ya que del **M** y del **D-M** se requiere una concentración 4.8 veces inferior a la del metronidazol, para lograr el 100 % de inhibición en el crecimiento de la bacteria, mientras que para el **D** esa concentración es 19 veces inferior y del **H** se requiere de una concentración inferior en dos órdenes de magnitud a la del antibiótico para conseguir el efecto inhibitorio. Sin embargo, si se compara a estos extractos con los antibióticos amoxicilina y claritromicina, su efectividad está muy distante de superar los valores de MIC.

7.1.3.- Evaluación de la toxicidad aguda de los extractos in vivo

La determinación de la toxicidad aguda comprende dos etapas, en las cuales se administra una dosis única [Etapa 1 (10,100 y 100 mg/kg); Etapa 2 (1600, 2900 y 5000 mg/kg)] de los extractos, y los individuos experimentales se mantienen bajo observación durante 14 días. Dado que ninguno de los individuos experimentales murió, a lo largo de la primera etapa, se evaluaron las dosis comprendidas en la segunda etapa, donde nuevamente ninguno de los ratones murió.

La evaluación, de la toxicidad aguda mediante el modelo de Lorke, permitió demostrar que ninguno de los cuatro extractos es letal bajo administración aguda a las dosis evaluadas, determinándose que la dosis letal media es mayor a los 5000 mg/kg para todos ellos. Adicionalmente, los animales no mostraron cambios de comportamiento (ataxia, hiper o hipoactividad), peso corporal o en la morfología macroscópica de hígado, riñones, bazo, pulmones y corazón, con respecto al control negativo.

Considerando que los extractos no son tóxicos, bajo administración aguda, este primer paso es muy importante ya que el análisis toxicológico, de plantas medicinales, es vital antes de realizar cualquier estudio farmacológico. Es pertinente mencionar que no se cuenta con un reporte previo sobre *C. procera*.

Por otro lado, con el objetivo de realizar posteriormente las evaluaciones farmacológicas, bajo modelos agudos para determinar el efecto gastroprotector y antiinflamatorio de los extractos, era necesario garantizar que no fueran letales o generaran algún signo de toxicidad en los individuos experimentales, los resultados y los criterios de Lorke clasifican como no tóxicos a aquellas sustancias con DL_{50} mayor a los 5 g/kg. Por lo que, los cuatro extractos entran en esta categoría.

7.1.4.- Evaluación de la actividad gastroprotectora de los extractos in vivo

Una vez garantizada la inocuidad de los cuatro extractos, bajo administración aguda, se llevó a cabo la determinación de la actividad gastroprotectora, empleando el modelo de úlcera aguda inducida por etanol absoluto en ratón.

Los resultados mostraron que el **H** y el **M** ejercen un efecto gastroprotector destacable, si se compara con el efecto de la carbenoxolona que es un compuesto puro, con un máximo de gastroprotección del 80 % a la dosis de 300 mg/kg y una dosis efectiva

media de 1.06 y 0.53 mg/kg para el **H** y el **M**, respectivamente (figuras. 9 y 10). Para ambos casos, el efecto observado fue dosis-dependiente, dejando claro, que estos extractos podrían ser fuentes potenciales de compuestos gastroprotectores. El **D** y el **DM**, a pesar de contener un perfil similar al **H** y al **M**, respectivamente, quizá contienen además otros compuestos, que posiblemente tengan un efecto antagónico, sobre los compuestos gastroprotectores, y que por esta razón la actividad gastroprotectora se abata, o bien que sean proporcionalmente mayoritarios, diluyendo el efecto, por lo que a las dosis evaluadas, el efecto ya no se detecta en la misma medida.

Los resultados mencionados se complementaron con un análisis histopatológico del tejido gástrico, con la técnica de hematoxilina-eosina (H-E) e histoquímico con ácido peryódico de Schiff (APS) y azul alciano pH 2.5 (AA) para evidenciar, a través de un color fucsia, la presencia de moco neutro, y de un color azul la de moco ácido respectivamente. Ambos tipos de moco se producen frente a un estímulo, ya sea por agentes irritantes o injuriantes. Sin embargo, el que se produce mayoritariamente es el neutro, sobre todo para cubrir el epitelio de la mucosa gástrica.

Cabe mencionar, que el estómago del ratón debe analizarse de la siguiente manera: está conformado por dos porciones, la continuación del esófago, que se aprecia como un tejido casi translucido similar a la piel de cebolla, y la porción glandular, que es la zona donde se forman las úlceras, y por lo tanto nuestro universo de estudio.

Las observaciones demuestran que la administración de **M** y de **H** abaten el efecto injuriantes del alcohol, ya que en los tejidos se observa la estructura de la mucosa bien conservada, moderado infiltrado eritrocitario e inflamatorio (figuras 14 B y 15 B) y APS positividad (13 C y 15 C), lo que se traduce como presencia de moco neutro. Sin embargo, con el **H** además de APS positividad, también se observa AA positividad (presencia de moco ácido), (Figura 15 D), lo que sugiere que es probable que el mecanismo de acción de ambos extractos pudiera ser diferente, ésta hipótesis se fortalece si tomamos en cuenta que se trata de los dos extremos de polaridad y que es muy alta la probabilidad de que diferentes tipos de compuestos se encuentren contenidos en estos dos extractos.

Es generalmente aceptado que la úlcera gástrica es el resultado de un desequilibrio, entre los factores agresivos y los factores encargados del mantenimiento de la integridad de la mucosa, a través de un mecanismo endógeno de defensa.

El modelo de úlcera aguda, inducida por etanol, se emplea ampliamente en la evaluación experimental de la actividad antiulcerogénica. El daño a la mucosa gástrica, generado por el etanol, se relacionan con alteraciones en la secreción gástrica y en la permeabilidad de la mucosa, depleción del moco gástrico y producción de radicales libres (Bucciarelli *et al.*, 2007). Un candidato para una terapia efectiva, de la úlcera gástrica, debería actuar básicamente reduciendo los factores agresivos que dañan a la mucosa gástrica, o bien, incrementando la resistencia de la misma a través de los factores defensivos propios de la mucosa gástrica. La administración del **H** y del **M** pareciera ejercer este último efecto, dado que la histoquímica demostró presencia notable *in situ* de moco gástrico, en comparación con el control negativo.

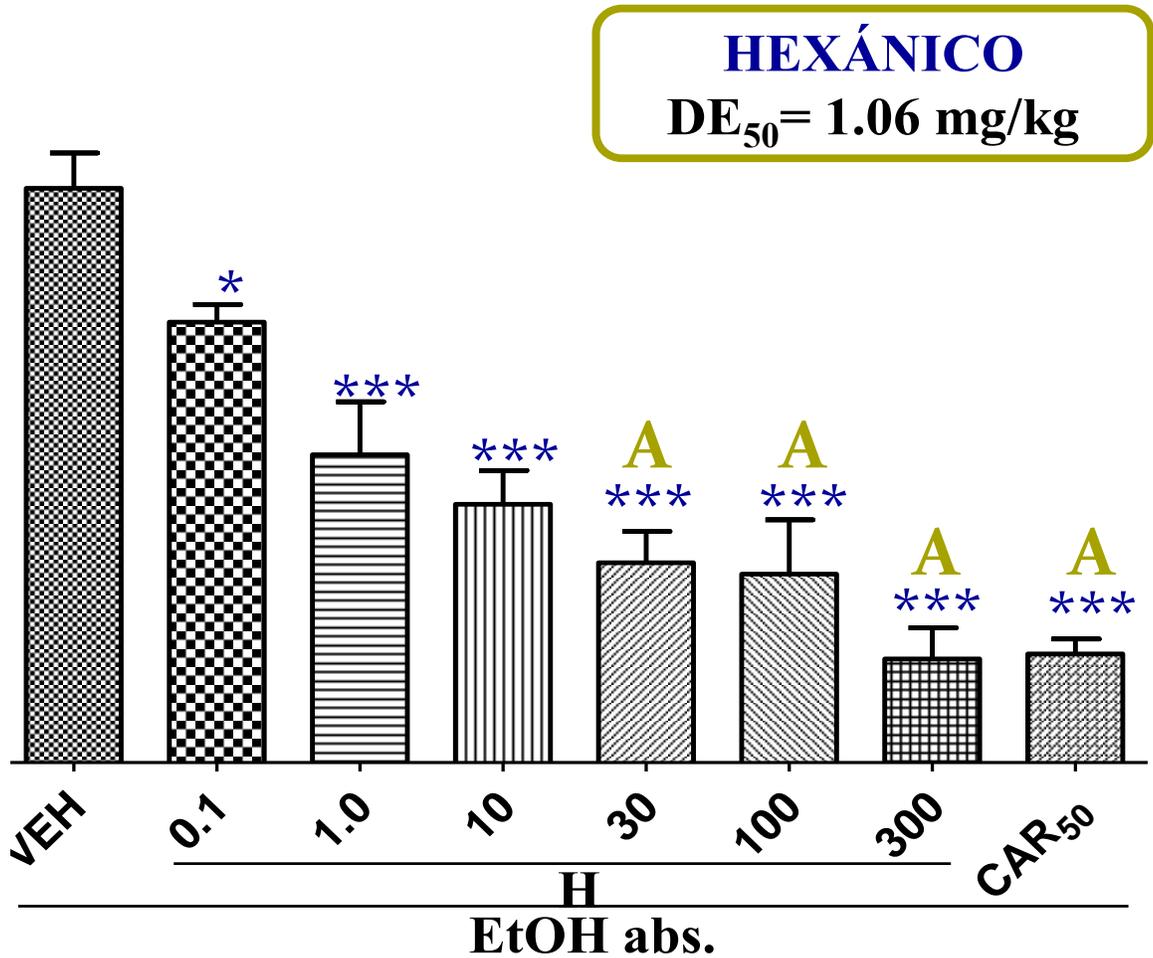


Figura 9. Curva dosis respuesta del efecto gastroprotector del **H**. La gráfica muestra el índice de úlcera en mm² (es decir, el área dañada, por la injuria del etanol, que se observa en forma de úlceras necrosantes en la mucosa de los estómagos de los ratones), con respecto a las diferentes dosis administradas del **H** (extracto hexánico). También se muestra el efecto del fármaco de referencia positivo CAR50 (carbenoxolona 50 mg/kg) y el del control negativo VEH (SSI) que denota el daño máximo generado. Las diferencias estadísticas se determinaron con respecto al control negativo, mientras que las igualdades estadísticas son con respecto a la carbenoxolona. Cada barra representa el promedio de tres réplicas ± error estándar de la media, n ≥8. ANOVA (Kruskal-Wallis). Comparación múltiple de medias de Duncan. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. A, denota igualdad estadística.

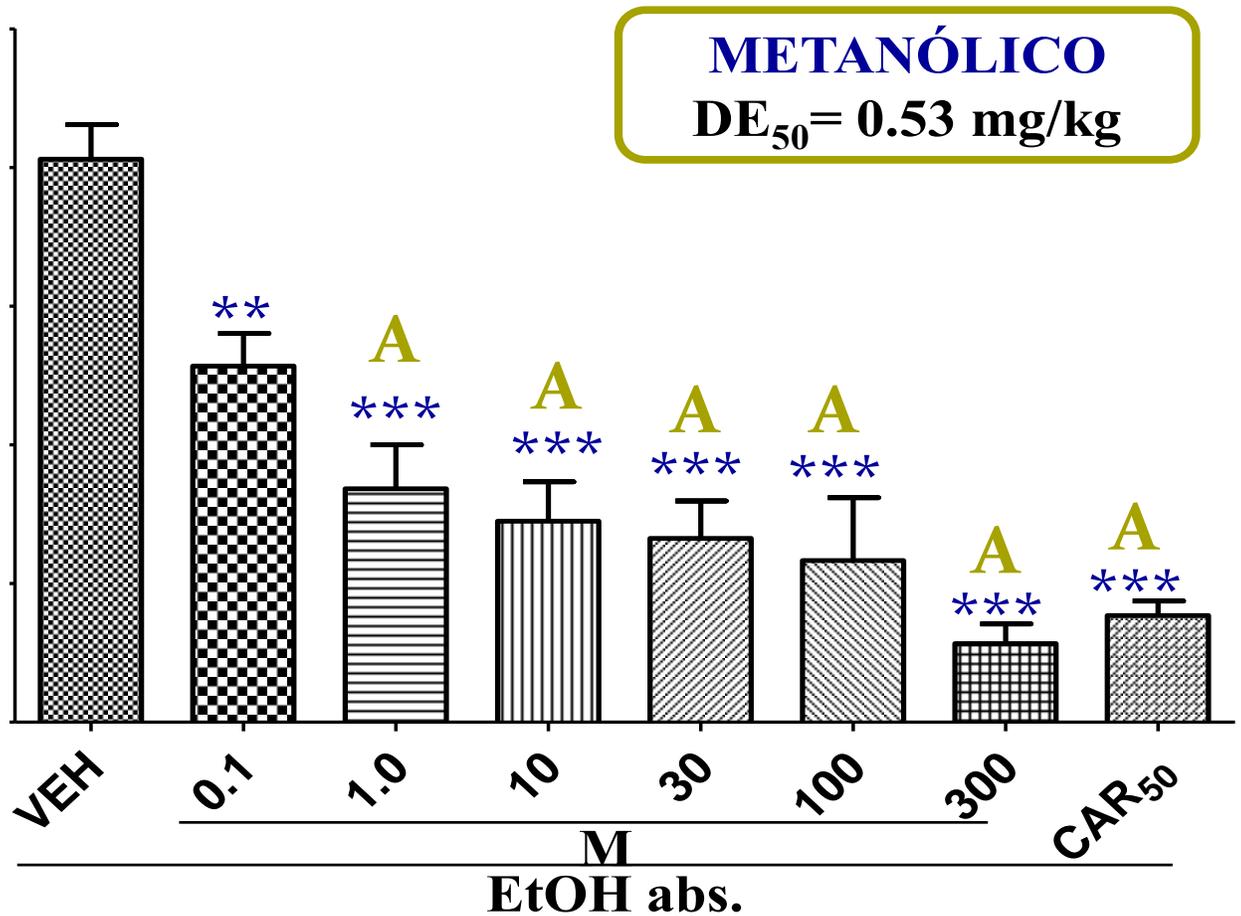
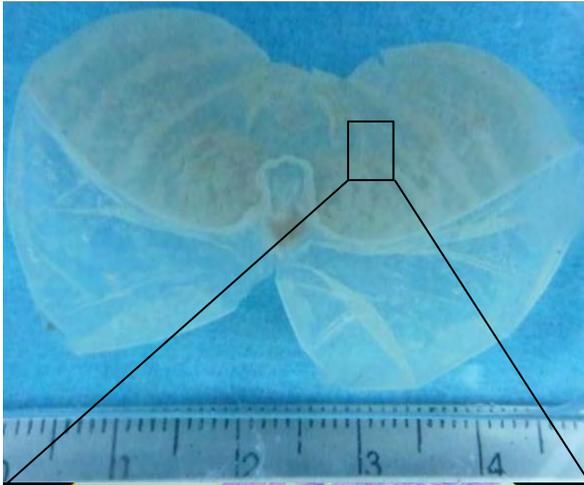
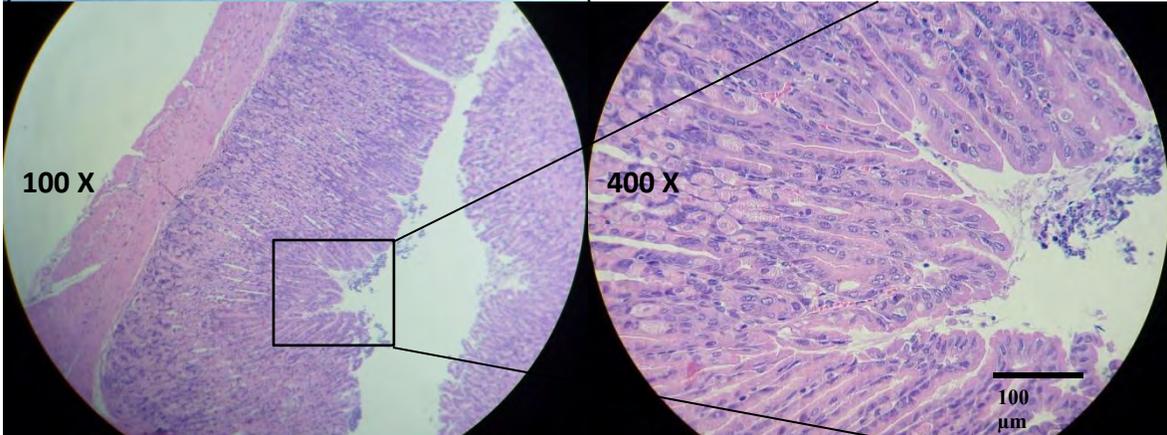
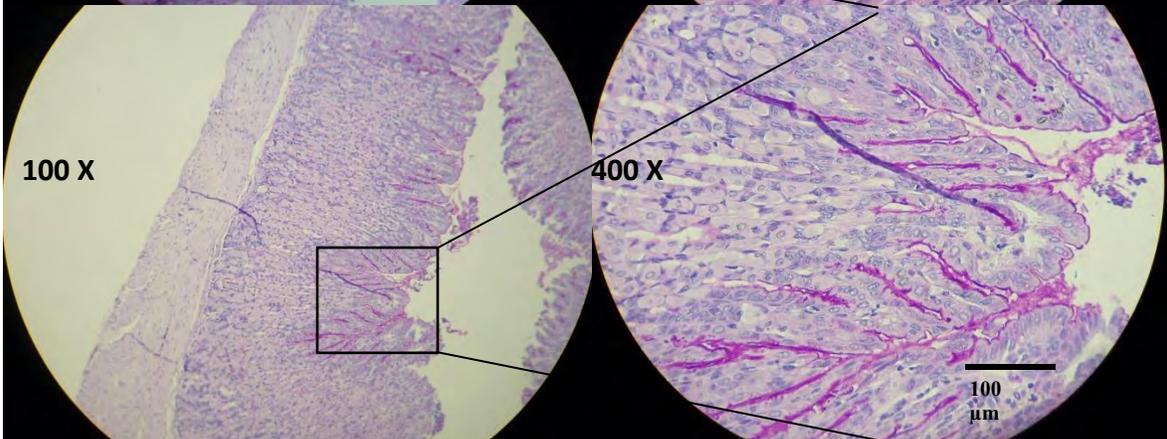
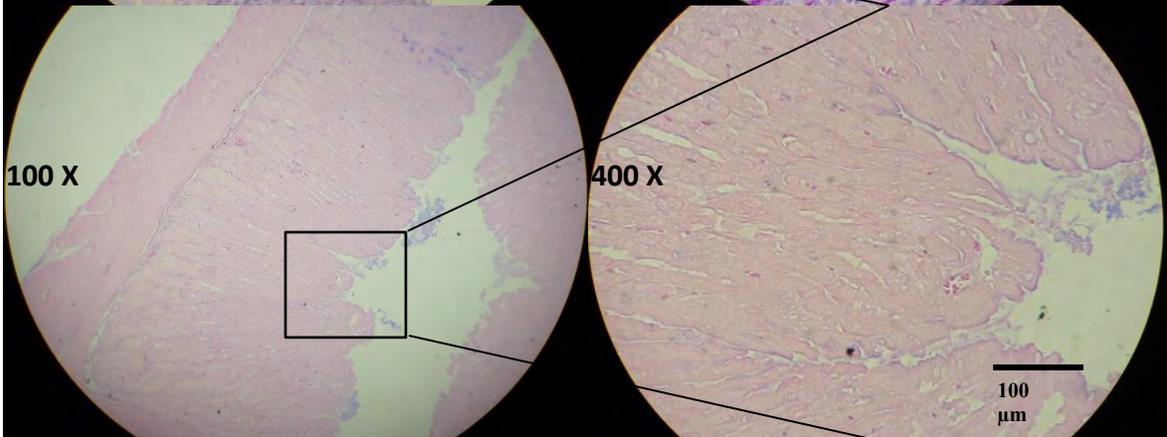


Figura 10. Curva dosis respuesta del efecto gastroprotector del M. La gráfica muestra el índice de úlcera en mm² (es decir, el área dañada, por la injuria del etanol, que se observa en forma de úlceras necrosantes en la mucosa de los estómagos de los ratones), con respecto a las diferentes dosis administradas del M (extracto metanólico). También se muestra el efecto del fármaco de referencia positivo CAR50 (carbenoxolona 50 mg/kg) y el del control negativo VEH (SSI) que denota el daño máximo generado. Las diferencias estadísticas se determinaron con respecto al control negativo, mientras que las igualdades estadísticas son con respecto a la carbenoxolona. Cada barra representa el promedio de tres réplicas ± error estándar de la media, n ≥ 8. ANOVA (Kruskal-Wallis). Comparación múltiple de medias de Duncan. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. A, denota igualdad estadística.

A**Figura 11.** Estómago de ratón sin tratamiento.

A Apariencia macroscópica. **B**, **C** y **D**, observaciones microscópicas de secciones sagitales, de 5 μm de espesor, de la porción glandular del estómago, a ampliaciones de 100X y 400X. **B** Técnica H-E para apreciación histopatológica. **C** y **D** Tinción de APS y AA, respectivamente para análisis histoquímico.

B**C****D**

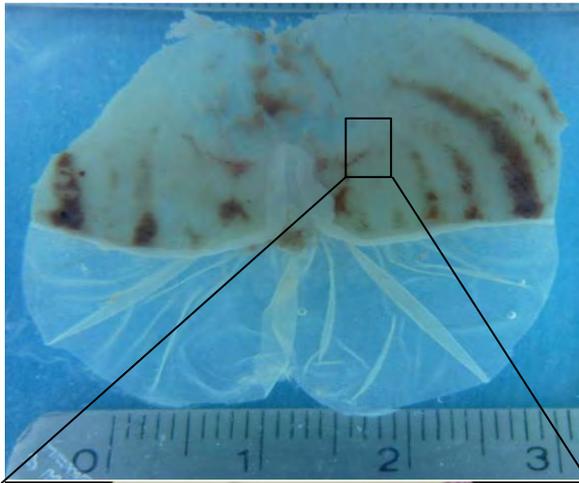
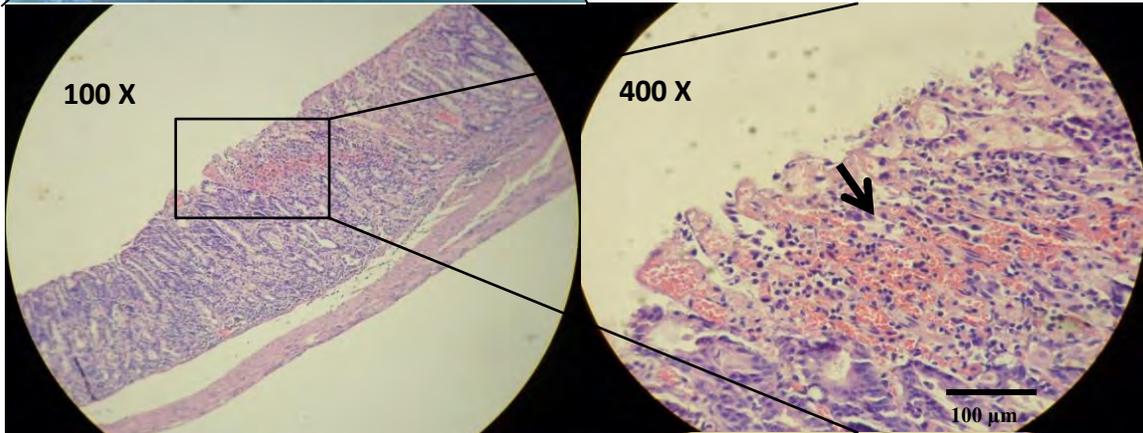
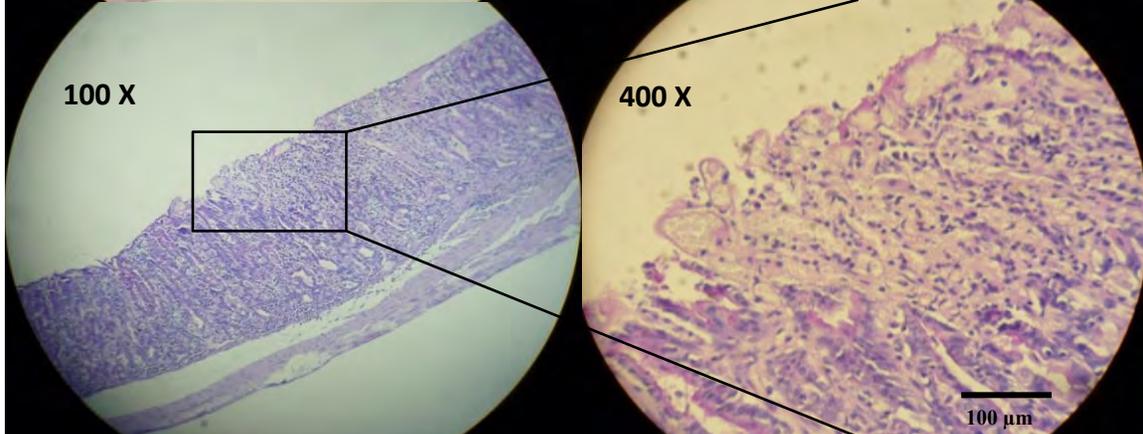
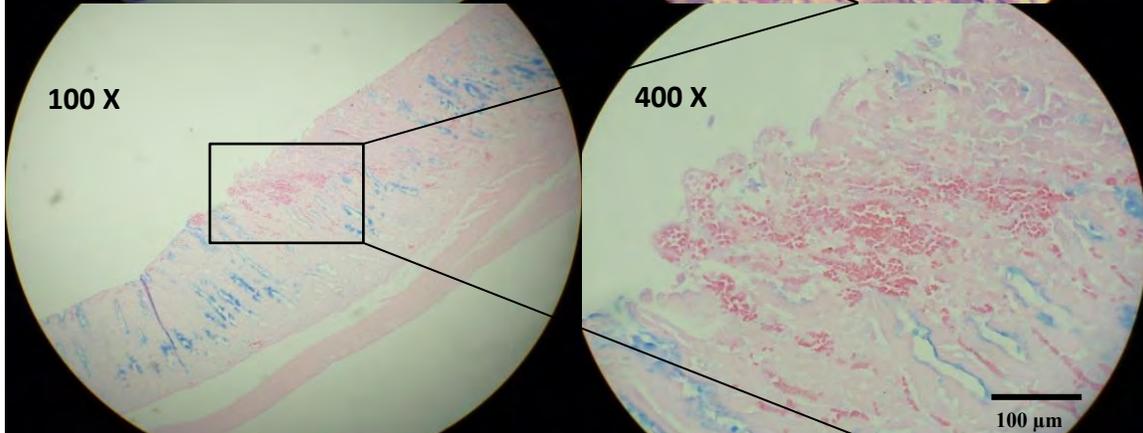
A

Figura 12. Estómago de ratón tratado con SSI + EtOHabs.

A Apariencia macroscópica. **B**, **C** y **D**, observaciones microscópicas de secciones sagitales, de 5 μm de espesor, de la porción glandular del estómago, a ampliificaciones de 100X y 400X **B** Técnica H-E para apreciación histopatológica **C** y **D** Tinción de APS y AA para análisis histoquímico respectivamente. La flecha denota una zona de disrupción del epitelio, con infiltrado eritrocitario e inflamatorio.

B**C****D**

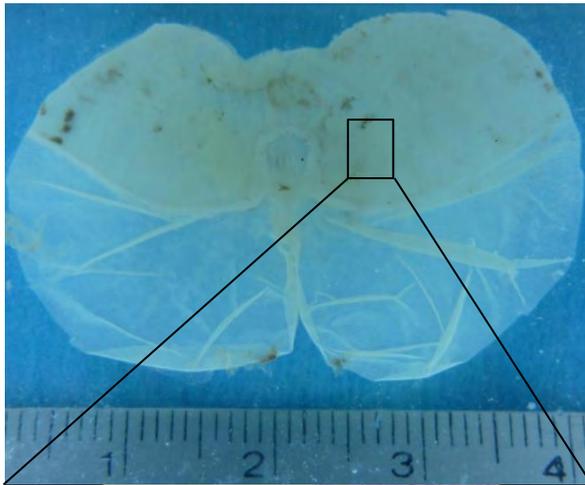
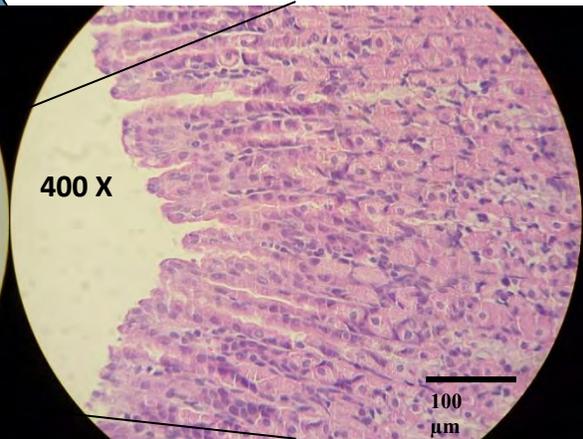
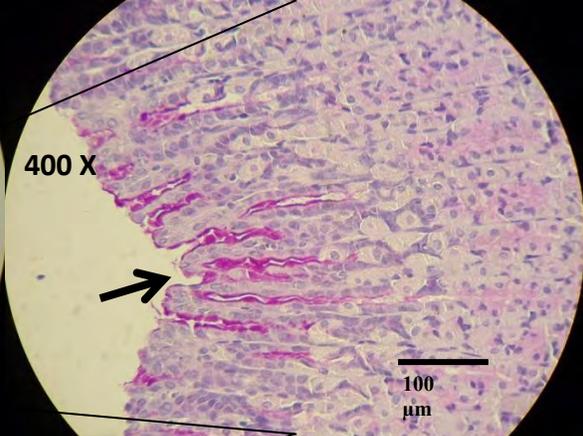
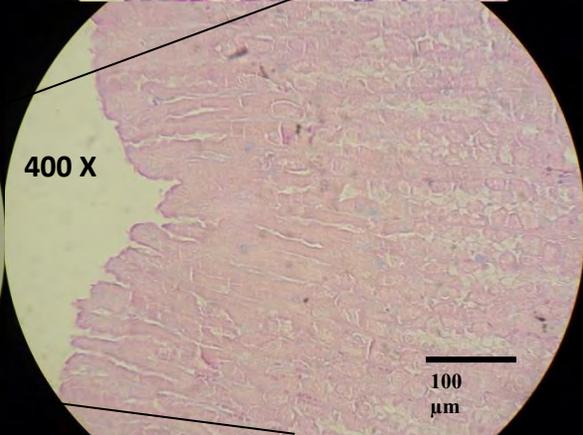
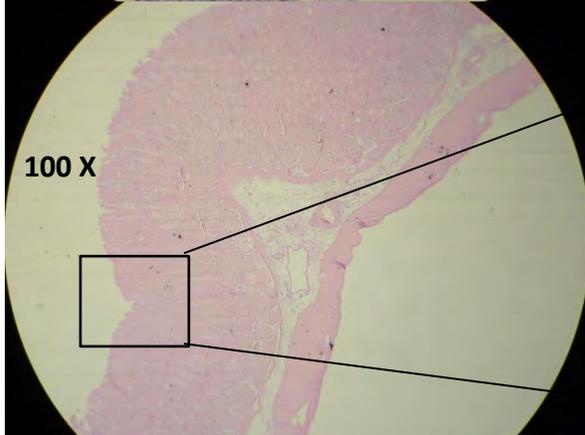
A

Figura 13. Estómago de ratón tratado con Carbenoxolona (50 mg/kg) + EtOHabs.

A Apariencia macroscópica. **B, C y D,** observaciones microscópicas de secciones sagitales, de 5 μm de espesor, de la porción glandular del estómago, a ampliificaciones de 100X y 400X **B** Técnica H-E para apreciación histopatológica **C y D** Tinción de APS y AA para análisis histoquímico respectivamente. La flecha denota una zona de APS positividad, con producción de gránulos de moco neutro.

B**C****D**

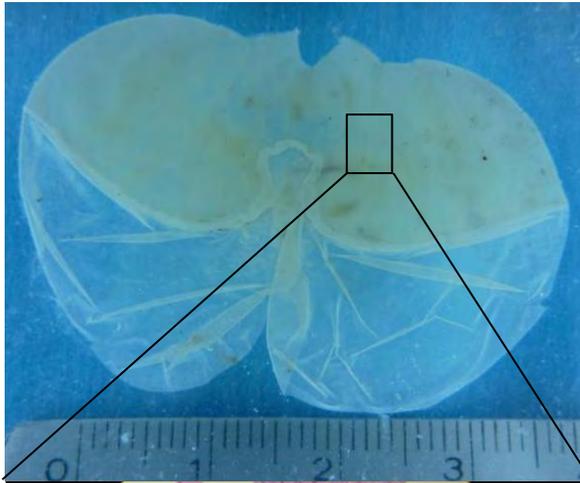
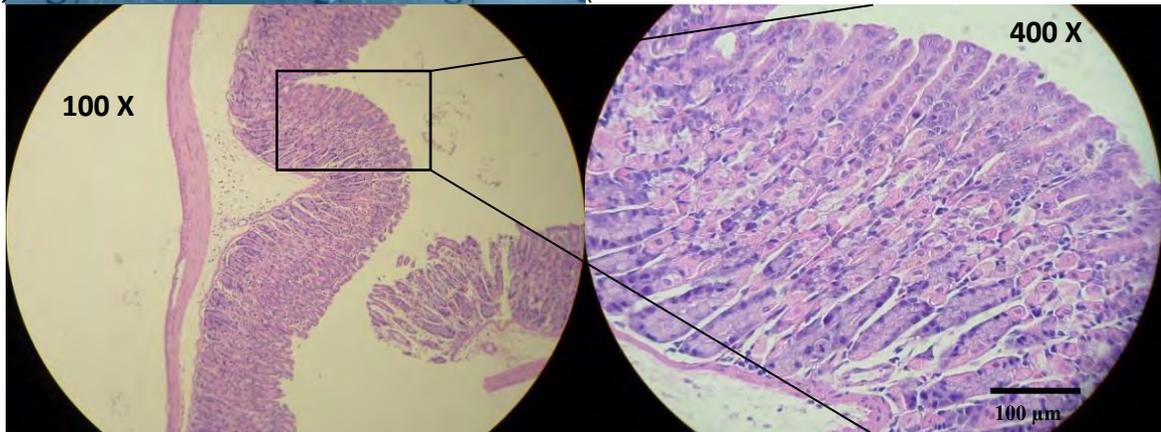
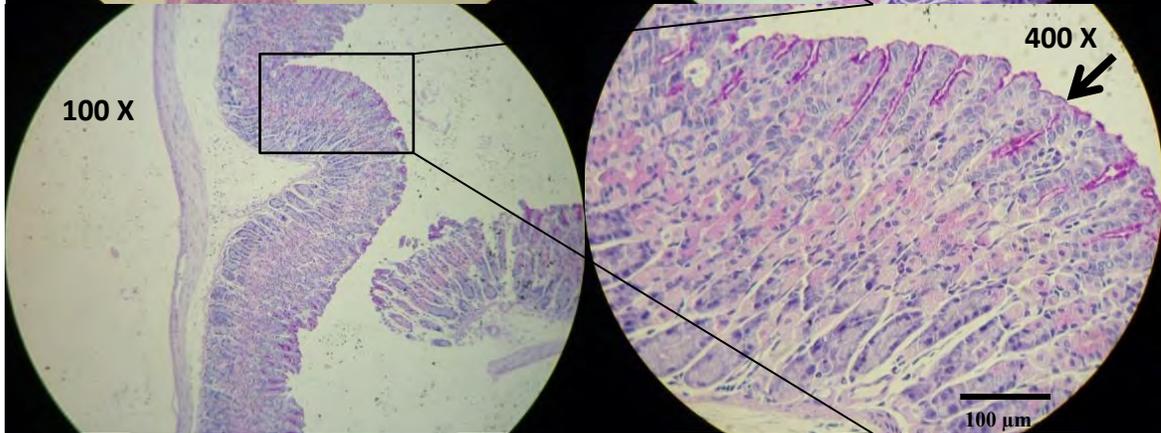
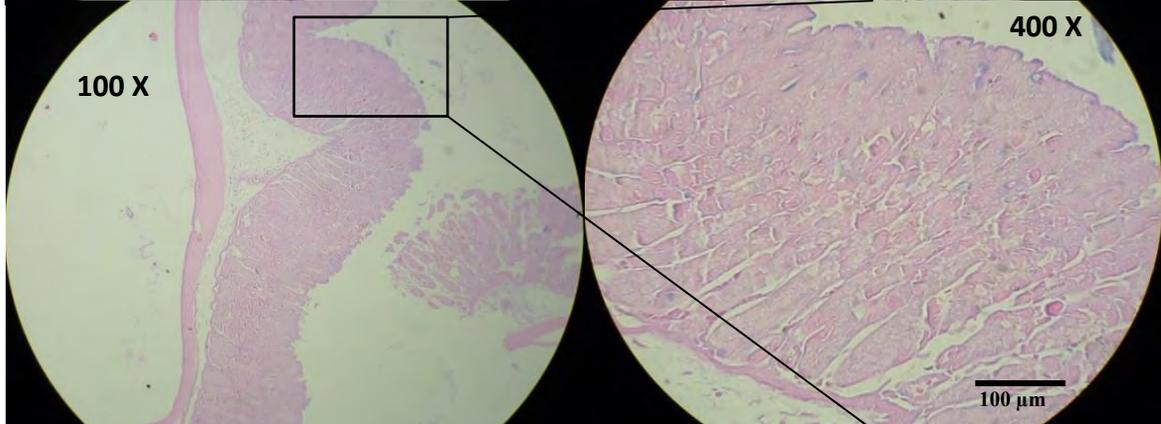
A

Figura 14. Estómago de ratón tratado con M (300 mg/kg) + EtOHabs.

A Apariencia macroscópica. **B, C y D,** observaciones microscópicas de secciones sagitales, de 5 μm de espesor, de la porción glandular del estómago, a ampliificaciones de 100X y 400X **B** Técnica H-E para apreciación histopatológica **C y D** Tinción de APS y AA para análisis histoquímico respectivamente. La flecha denota una zona de APS positividad, con producción de gránulos de moco neutro y apreciable integridad del epitelio.

B**C****D**

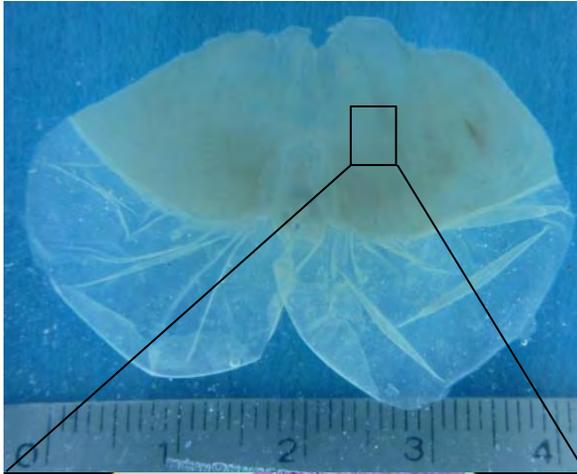
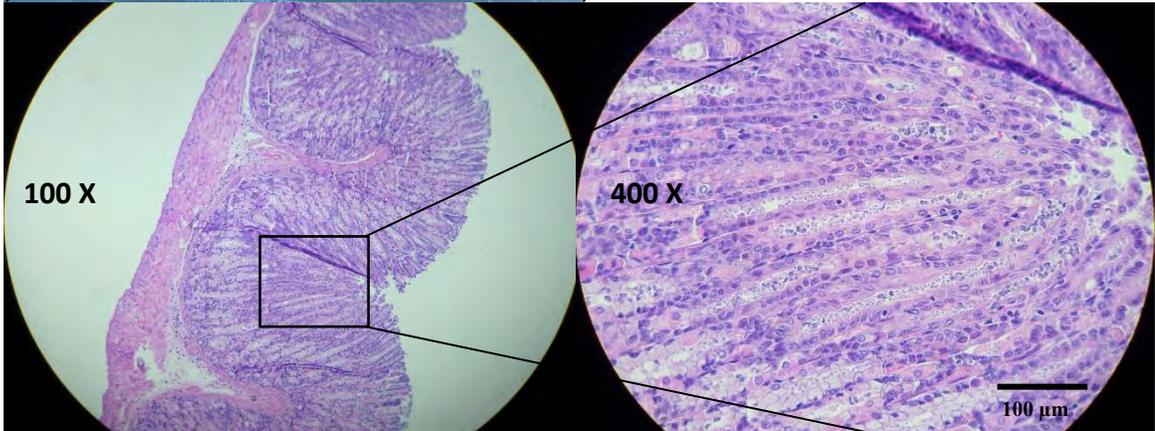
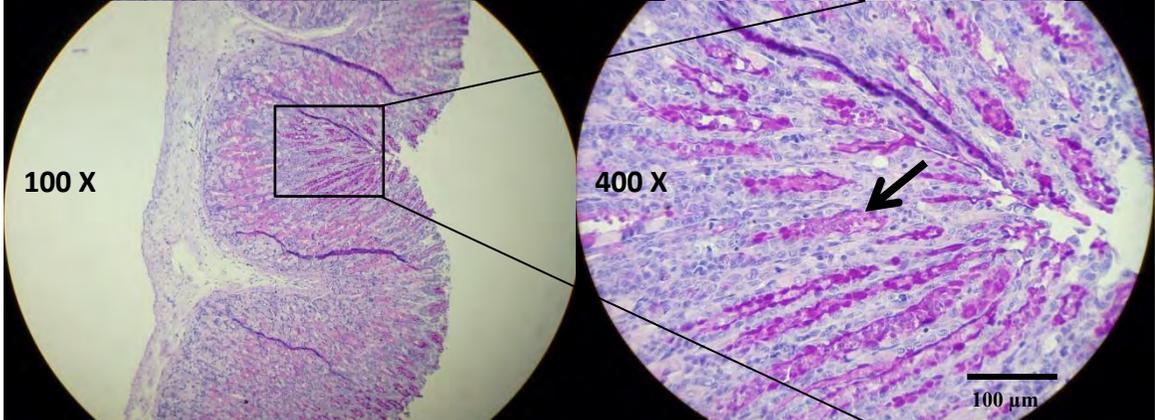
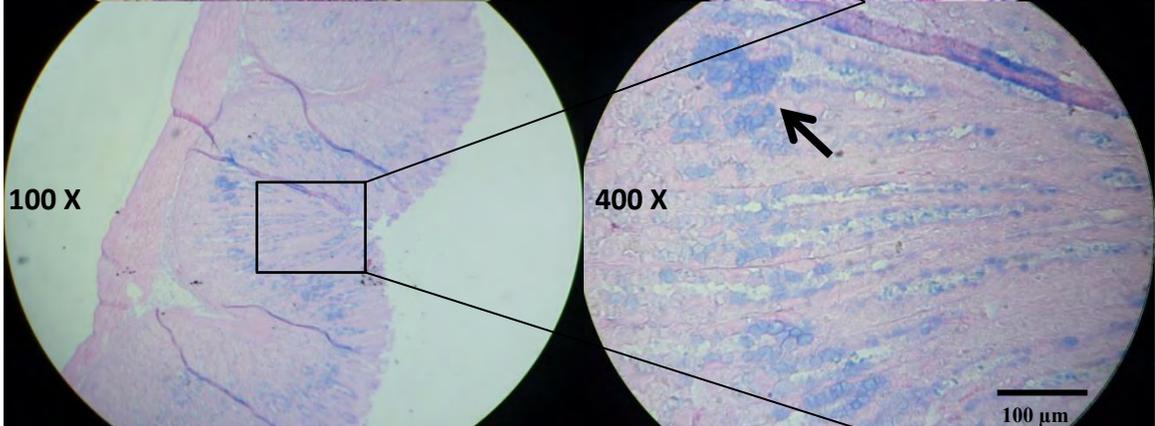
A

Figura 15. Estómago de ratón tratado con **H** (300 mg/kg) + EtOHabs.

A Apariencia macroscópica. **B**, **C** y **D**, observaciones microscópicas de secciones sagitales, de 5 μm de espesor, de la porción glandular del estómago, a ampliaciones de 100X y 400X **B** Técnica H-E para apreciación histopatológica **C** y **D** Tinción de APS y AA para análisis histoquímico respectivamente. La flecha en **C** denota una zona de APS positividad, con producción de gránulos de moco neutro y la flecha en **D** AA positividad indicando presencia de moco ácido.

B**C****D**

7.1.5.- Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos *in vivo*

El modelo de edema agudo, inducido por ATF, es ampliamente empleado para evaluar si los tratamientos experimentales, poseen o no, la propiedad de prevenir la reacción inflamatoria en respuesta a un agente flogístico.

Las ventajas de este modelo son que se requieren cantidades pequeñas de los tratamientos, la respuesta es local y la administración tópica evita el proceso de metabolismo y excreción.

Los ésteres de forbol, como el ATF, producen irritación cutánea y respuesta hiperproliferativa con infiltración de neutrófilos.

Estimulan a la fosfolipasa A₂, conduciendo a la liberación de ácido araquidónico, dando lugar a la producción de prostaglandinas.

En consecuencia, los inhibidores de estas moléculas, como la Indometacina reducen el edema inducido por ATF (De Young *et al.*, 1989).

El **H** posee actividad antiedematogénica y su efecto es dosis-dependiente, con un máximo de inhibición del edema del 57 % a la dosis de 3 mg/oreja.

La aplicación tópica del **H** reduce de manera significativa el edema ($p \leq 0.05$) (figura 16), la dosis efectiva media calculada fue de 1.75 µg/oreja.

El resto de los extractos nunca alcanzaron el 50 % de inhibición del edema, incluso a la dosis mayor evaluada, además el **DM** y el **M** no pudieron ser evaluados, a dosis mayores a 1 mg/oreja, debido a problemas de solubilidad.

La actividad determinada para el **H** puede considerarse moderada, si se le compara con los fármacos de referencia indometacina y dexametasona, los cuales a dosis muy bajas 0.5 y 0.005 mg/oreja, respectivamente, ejercen su efecto antiinflamatorio.

Ningún estudio previo había reportado la actividad antiinflamatoria del extracto, por lo que estos resultados son una contribución importante, acerca del conocimiento farmacológico de *C. procera*.

No obstante, faltaría evaluar el efecto en otros modelos, ya que tal vez mediante otro tipo de administración y parámetros de evaluación, posiblemente se observe un mejor efecto.

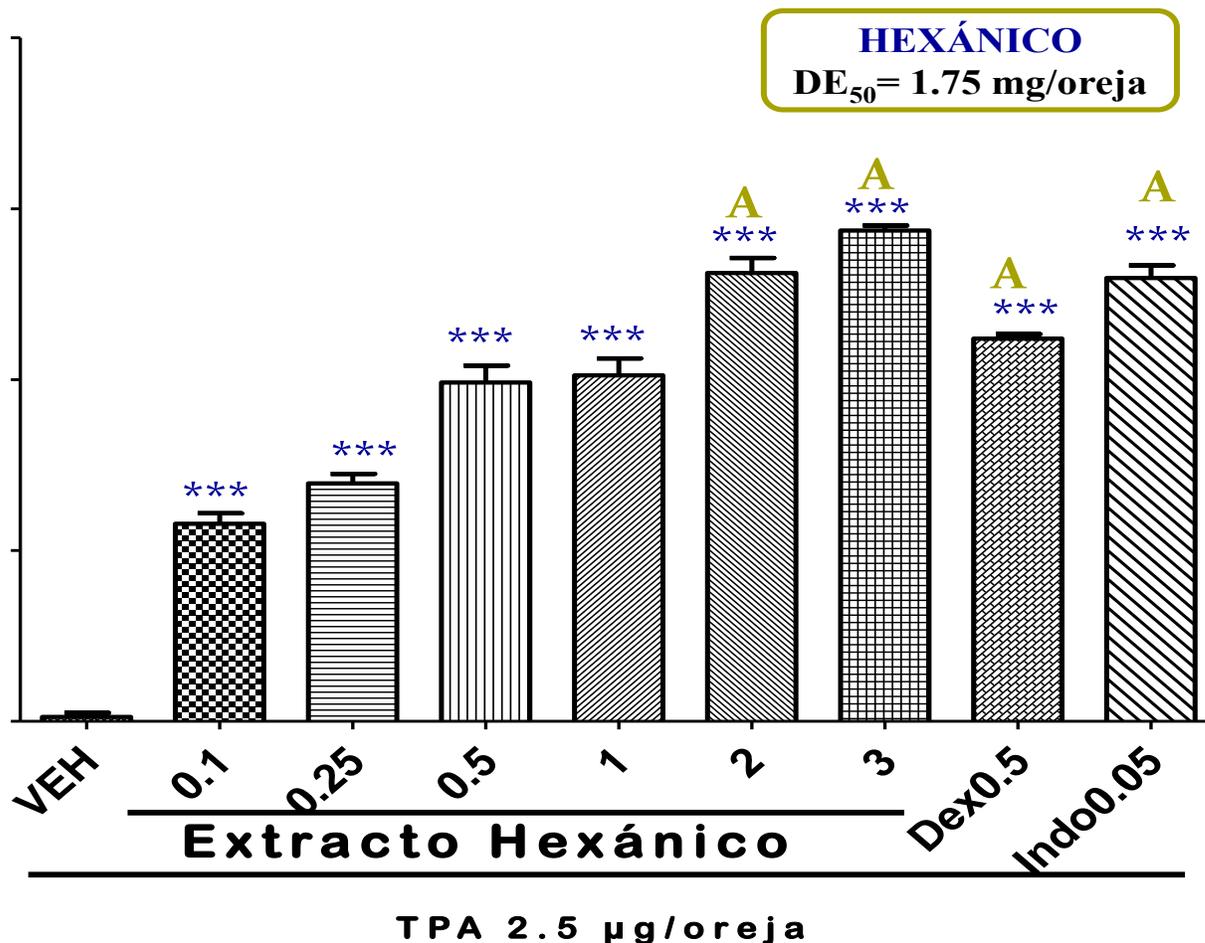


Figura 16. Curva dosis respuesta del efecto antiinflamatorio del H. La gráfica muestra el porcentaje de inhibición del edema (es decir, la proporción en que disminuye el edema auricular de los individuos de cada grupo), con respecto a las diferentes dosis administradas tópicamente del H (extracto hexánico). También se muestra el efecto de los fármacos de referencia positivos Dex0.5 (dexametasona 0.5 mg/oreja) e Indo0.05 (Indometacina 0.05 mg/oreja), y el del control negativo VEH (acetona), que denota el edema máximo generado. Las diferencias estadísticas se determinaron con respecto al control negativo, mientras que las igualdades estadísticas son con respecto a la dexametasona y a la indometacina. Cada barra representa el promedio de tres réplicas \pm error estándar de la media, $n \geq 8$. ANOVA (Kruskal-Wallis). Comparación múltiple de medias de Duncan. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. A, denota igualdad estadística.

7.1.6.- Conclusiones de la Fase 1

En la Tabla 1 se muestra un resumen, de todos los resultados obtenidos en esta primer parte de la Tesis, correspondientes a los objetivos de la fase 1.

El análisis de los resultados, permitió concluir que el **H** posee las 3 actividades esperadas, sin embargo, una limitante para continuar estudiando a éste extracto es su muy bajo rendimiento (0.9 %).

Por lo que se planteó proseguir su estudio, de manera biodirigida, por la actividad anti-*H. pylori*, ya que se requieren cantidades pequeñas para realizar las evaluaciones y de esta manera se puede garantizar la obtención de al menos un compuesto puro.

Tabla I. Resumen de resultados de la Fase 1 para **H, D, DM** y **M**.

Extracto	Rendimiento (% en peso seco)	ACTIVIDAD			
		Toxicidad aguda DL ₅₀ (mg/kg)	Anti- <i>H. pylori</i> CMI (µg/mL)	Antiinflamatoria DE ₅₀ (mg/oreja)	Gastroprotectora DE ₅₀ (mg/kg)
H	0.90	> 5,000 para los 4 extractos	7.81	1.75	1.06
D	1.07		15.6	> 3	> 300
DM	12.80		62.5	> 1	> 300
M	13.22		62.5	> 1	0.53
Controles Positivos de Referencia			Metronidazol: 250 Claritromicina: 0.5 Amoxicilina: 0.05	Dexametasona: 0.05 Indometacina: 0.5	Carbenoxolona: 0.24

Por otro lado, el **M** posee la mejor actividad gastroprotectora, una buena actividad anti-*H. pylori*, y sobre todo, un buen rendimiento (13.2 %).

Por lo que se propuso emplear este extracto para continuar con el estudio de gastroprotección ya que, en este caso, se requieren de cantidades considerables.

Los resultados, anteriormente mencionados, sirvieron para generar el primer manuscrito derivado del presente trabajo de tesis (Escobedo-Hinojosa *et al.*, 2012).

Las conclusiones, de esta primer parte, nos permitieron plantear las metas a realizar sobre la fase 2, es decir, el estudio de los extractos más activos.

De *C. procera*:

- Obtener cantidad considerable del **H**.
- Obtener cantidad considerable del **M**.

Del **M**:

- Dilucidar su posible mecanismo, de gastroprotección, bajo un modelo agudo.
- Determinar la toxicidad bajo un modelo subagudo.
- Evaluar el efecto resolutivo, de úlcera gástrica preexistente, bajo un esquema de administración subaguda.

Del **H**:

- Determinar su efecto sobre la bacteria.
- Realizar el aislamiento, de compuestos puros, de manera biodirigida por la actividad anti-*H. pylori*.

De los **compuestos aislados del H**:

- Realizar la identificación mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
- Determinar su efecto sobre la bacteria.

Evaluar: citotoxicidad, toxicidad, actividad gastroprotectora y efecto antiinflamatorio; si el rendimiento lo permite.

7.2.- Fase 2

7.2.1.- Resultados referentes al M:

A partir de 1.5 kg de corteza se obtuvieron 431 g del **M**, lo que equivale al 28.3 % de rendimiento en peso seco. Se corroboró el efecto gastroprotector del extracto, mediante el modelo de úlcera aguda inducida por etanol absoluto en ratón, la DE₅₀ determinada fue de 0.71 mg/kg-ratón, valor muy semejante al obtenido previamente (**7.1.4**).

7.2.1.1- Mecanismo de acción del M

Son varios los mecanismos que protegen, naturalmente, a la mucosa gástrica (apéndice A). Para su estudio se dispone de varias moléculas, que actúan bloqueando algunos de los mismos y por lo tanto, se puede determinar si el efecto, del tratamiento experimental, se relaciona con la participación de alguno de estos mecanismos.

Dentro de las más estudiadas y mejor caracterizadas se encuentran: el éster metílico de la nitro-L-arginina (L-NAME), la indometacina, la N-etilmaleimida (NEM) y la glibenclamida.

El objetivo de emplear a estas moléculas, como pretratamientos en el modelo de úlcera aguda inducida por etanol, es para evaluar la participación de los siguientes mecanismos, respectivamente: óxido nítrico endógeno, prostaglandinas endógenas, grupos sulfhidrilos y canales de potasio dependientes de ATP.

En la figura 17 se muestran los resultados, del experimento realizado, para determinar el posible mecanismo de gastroprotección del **M**. La gráfica presenta el daño gástrico generado, expresándolo como índice de úlcera en mm^2 , con respecto a cada uno de los tratamientos.

La zona azul se refiere a la validación, de cada uno de los pretratamientos, la cual se llevó a cabo en dos pasos: 1) administración de los pretratamientos y 2) administración del agente injuriente (etanol 7 mL/kg).

Cada uno de los pretratamientos aumentó el efecto dañino del etanol, generando un incremento significativo, en la magnitud del daño, con respecto a los individuos que sólo recibieron solución salina seguida de etanol. Mientras que la comparación múltiple de medias muestra homogeneidad, en el incremento del efecto dañino, de los pretratamientos.

Por otro lado, se observa el destacable efecto gastroprotector, que ya habíamos obtenido previamente, cuando se administran 100 mg/kg del **M** y es estadísticamente significativo con respecto al vehículo y a los pretratamientos.

La zona roja demuestra el análisis, de cada uno de los pretratamientos, con respecto al **M** para determinar si su administración abate el efecto gastroprotector del **M**, lo cual se traduce como participación del mismo en el mecanismo de acción.

El protocolo consiste en tres pasos: 1) administración de los pretratamientos, 2) administración del **M** (100 mg/kg) y 3) administración del etanol para inducir la ulceración.

Los resultados indican que existen diferencias, estadísticamente significativas, entre la gastroprotección del **M** sólo, y la del mismo con cada uno de los diferentes pretratamientos, ya que la actividad gastroprotectora, del extracto, disminuyó significativamente en cada uno de los casos.

La comparación múltiple de medias, entre tratamientos, indica que el efecto gastroprotector está relacionado parcialmente, y en magnitud similar, tanto con el papel de los canales de potasio dependientes de ATP, como con los grupos sulfhidrilo, una participación mayor de las prostaglandinas endógenas y del óxido nítrico.

Mmo WIEH

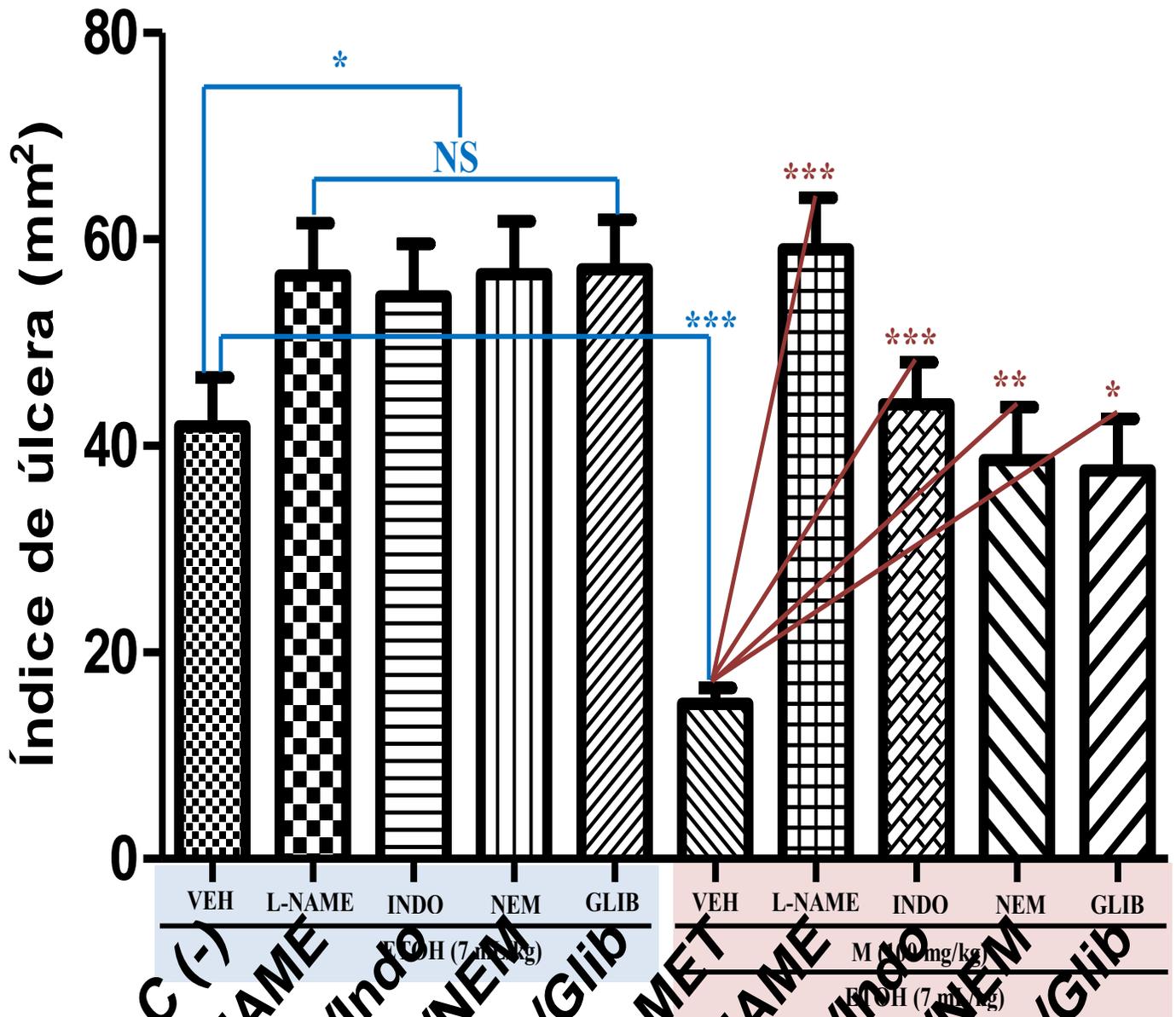


Figura 1. Efecto de los diferentes inhibidores de las vías de gastroprotección sobre la actividad gastroprotectora de M. La zona azul, se refiere a la validación de cada uno de los pretratamientos, la cual se llevó a cabo en dos pasos: 1) administración de los pretratamientos y 2) administración del agente injuriante (etanol 7 mL/kg). La zona roja, demuestra el análisis de cada uno de los pretratamientos con respecto al M, para determinar si su administración abate el efecto gastroprotector del M, lo cual se traduce como participación del mismo en el mecanismo de acción y se llevó a cabo en tres pasos: 1) administración de los pretratamientos, 2) administración del agente injuriante (etanol 7 mL/kg) y 3) administración del M a una dosis de 100 mg/kg. En líneas azules y rojas se muestran las comparaciones estadísticas, para determinar el posible mecanismo gastroprotector del M. VEH (SSI), L-NAME (Éster metílico de la nitroL-arginina), INDO (indometacina), NEM (N-etilmaleimida), GLIB (glibenclamida), M (extracto metanólico). Cada barra representa la media \pm EEM de $N \geq 8$. Análisis de varianza de una vía, postanálisis de Tukey para comparación múltiple de medias. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Análisis contra el control se denota en azul y contra el M en rojo.

Considerando lo anterior se decidió determinar, si el **M** también favorecía el proceso de resolución de la Úlcera Gástrica (**UG**), en un modelo *in vivo*. Para garantizar la seguridad del **M**, durante el ensayo de resolución de **UG**, se determinó en primer lugar su toxicidad subaguda.

7.2.1.2- Evaluación de la toxicidad subaguda del M

La determinación; de la toxicidad subaguda, se realizó usando como base el modelo de Lorke en ratones, con modificaciones y en dos modalidades: En el experimento **I**), se les administró una dosis del **M** por día por 20 días (10, 100 o 1000 mg/kg-ratón), en el **II**), se les administraron dos dosis por día de 100 o 300 mg/kg-ratón durante 20 días. Tras el último día de administración cinco ratones, de cada grupo, fueron sacrificados mediante punción cardiaca. Los cinco individuos restantes, de cada grupo, se sacrificaron 15 días posteriores al último día de la administración.

Los resultados mostraron, que la administración del **M** durante 20 días consecutivos a las diferentes dosis y bajo las dos modalidades, no es letal ya que ninguno de los individuos, de experimentación, murió a lo largo del experimento. Si bien era necesario descartar la toxicidad subaguda del extracto, para garantizar su inocuidad, para su posterior administración en el ensayo de resolución de úlcera gástrica, nuestro interés, sobre este modelo, también iba encaminado a la identificación de alteraciones, secundarias a la administración prolongada de **M**. Por lo que se realizaron estudios sanguíneos, como el hemograma, que nos indica el conteo sanguíneo completo, que es uno de los elementos diagnósticos básicos en el que se expresan el número, proporción y variaciones de los elementos sanguíneos; como número de hematíes, hematocrito, hemoglobina e índices eritrocitarios, recuento y fórmula leucocitaria y número de plaquetas y la bioquímica sanguínea para analizar alteraciones, de algunos metabolitos sanguíneos, como glucosa, colesterol, triglicéridos pero sobre todo de aquellos que son indicativo de modificaciones en la función hepática y renal como las transaminasas, fosfatasa alcalina, bilirrubina, ácido úrico y urea.

Los resultados obtenidos, para los ratones sacrificados inmediatamente después del día 20 de administración, no reflejaron alteraciones significativas en ninguno de los parámetros, con respecto a los individuos control. Los individuos experimentales que se sacrificaron, 15 días después de la última administración del **M**, tampoco mostraron variaciones ni con respecto a los individuos de su grupo, sacrificados previamente, ni con respecto a los controles. Esto no sólo en términos sanguíneos, sino también con respecto al peso corporal, conducta, morfología macroscópica y peso de cada uno de los diferentes órganos. La única alteración, detectable, entre controles y los ratones a los que se les administró el **M** fue, el cambio en la consistencia de las heces, durante los primeros días, que posteriormente se normalizó. Con las variables anteriormente descritas, no se observaron alteraciones significativas con respecto a los controles, e incluso, en el análisis histopatológico tampoco se observó evidencia de que el **M** produjera alguna alteración, con respecto a los controles, en los órganos analizados.

7.2.1.3- Evaluación del efecto resolutivo de úlcera gástrica del M

Una vez descartada, la toxicidad subaguda, se realizó la evaluación del efecto resolutivo del **M** sobre la **UG**.

En primer lugar se indujo la injuria en los ratones, mediante la administración intragástrica de 7 mL/kg de etanol absoluto, y posteriormente se les administró el **M** por 20 días en dos modalidades: **A**) una dosis de 100 mg/kg-día y **B**) dos dosis de 100 o 300 mg/kg-día.

Para evaluar la resolución, mediada por el **M** de la **UG**, se sacrificaron 6-10 individuos de cada grupo al 5°, 10°, 15° y 20° día de administración y se llevó a cabo el análisis macroscópico, histopatológico e histoquímico a lo largo del ensayo.

La figura 18 representa la reducción del índice, de úlcera con respecto a cada uno de los tratamientos, a lo largo del tiempo. Por lo que la gráfica se analiza en cuatro zonas, correspondientes a cada uno de los cuatro tiempos monitoreados (5, 10, 15 y 20 días) durante la evaluación.

Las observaciones, tras 5 días de administración, de los diferentes tratamientos indican que: el **M** (300 mg/kg; 2 dosis/día) produce un efecto, de resolución de **UG**, significativo ($p \leq 0.001$), reduciendo el índice de úlcera de 47.34 a 23.68 mm², lo que se traduce en una reducción del 49.9 % del área ulcerada, al inicio del tratamiento, mientras que la carbenoxolona (50 mg/kg; 2 dosis/día) disminuyó el índice de úlcera en un 45.2%, con un nivel menor de significancia ($p \leq 0.05$). El resto de los tratamientos produjo una ligera disminución del daño, sin embargo, el valor no fue significativo y el vehículo no tuvo efecto alguno.

A los 10 días, post-tratamiento, el efecto del **M** (300 mg/kg; 2 dosis/día) disminuyó ligeramente a un 47.7% de resolución de la **UG**, sin embargo, el nivel de significancia no se modificó. El efecto de la carbenoxolona (50 mg/kg; 2 dosis/día) aumentó, tanto en porcentaje de resolución de la **UG** (51.9) como en significancia estadística ($p \leq 0.01$). Hasta este momento fue que el **M** (100 mg/kg; 2 dosis/día) mostró tener efecto resolutivo con un 39.8 % ($p \leq 0.05$). Tanto el efecto de carbenoxolona (50 mg/kg; 1 dosis/día) como el del **M** (100 mg/kg; 1 dosis/día) se mantuvo, sin ser significativo con respecto a $t=0$ así como el del vehículo.

Tras 15 días de administración se observó, para el **M** (300 mg/kg; 2 dosis/día), que el efecto se mantuvo constante, significativamente y numéricamente se detectó un ligero incremento en el porcentaje de resolución de la **UG** (54.5 %), por otro lado, la carbenoxolona (50 mg/kg; 2 dosis/día) incrementó, el efecto resolutivo, en términos numéricos (62.85 %) y de significancia ($p \leq 0.001$). La significancia para el **M** (100 mg/kg; 2 dosis/día) se incrementó ($p \leq 0.01$), mientras que el **M** (100 mg/kg; 1 dosis/día) ya presentó un efecto numérico (41.3 %) y significativo considerable ($p \leq 0.01$). Para el caso del vehículo, a pesar de reducir el daño en términos numéricos, el efecto sigue considerándose como no significativo.

TODO ORDENADO

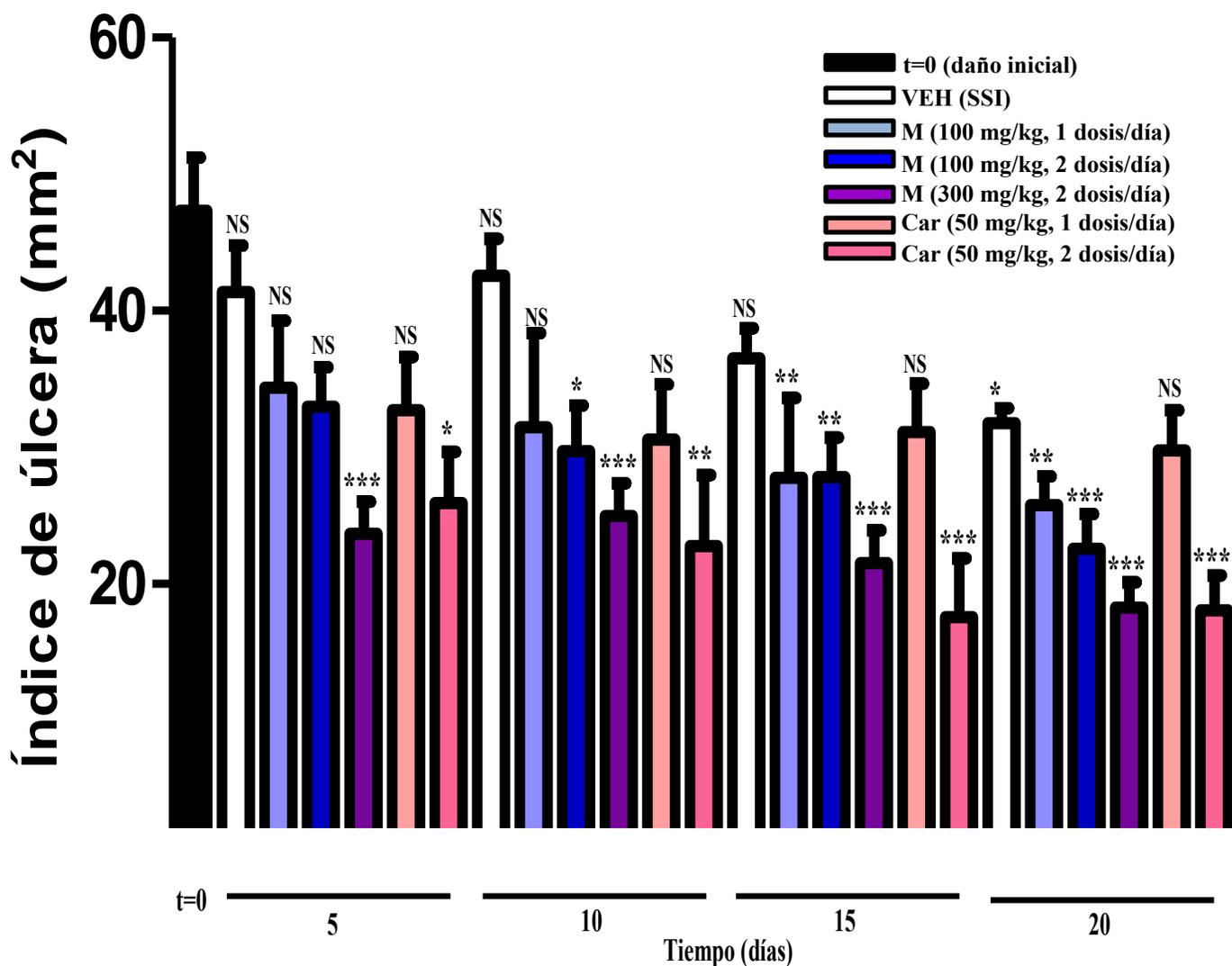


Figura 18. Efecto resolutorio sobre la UG del M en las diferentes modalidades. La gráfica muestra el índice de úlcera en mm² (es decir, el área dañada por la injuria del etanol que se observa, en forma de lesiones blanquecinas alargadas, en la mucosa de los estómagos de los ratones, ver figura 19, recuadro t=0), con respecto a las diferentes dosis administradas del M (extracto metanólico). Cada barra representa la media de dos réplicas ± EEM de N ≥ 8. Análisis de varianza de una vía, postanálisis de Tukey para comparación múltiple de medias. * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. Todas las comparaciones estadísticas se realizarán contra t=0.

El análisis de los resultados, tras 20 días de administración continua, mostró que los tratamientos: **M** (300 mg/kg; 2 dosis/día) y carbenoxolona (50 mg/kg; 2 dosis/día) mantienen constantes los niveles, de significancia, del efecto resolutorio mientras que numéricamente el valor del primero se incrementa a 61.48 y el del segundo se reduce a 61.82. Para el **M** (100 mg/kg; 2 dosis/día) se alcanza un efecto del 52.3 % de resolución y se incrementa el nivel de significancia ($p \leq 0.001$). Para el **M** (100 mg/kg; 1 dosis/día) se mantiene constante tanto en efecto como en significancia, y finalmente el vehículo tiene un efecto significativo de 31 % con respecto a la reducción del área ulcerada inicial.

Es de llamar la atención que, a lo largo de todo el ensayo, el efecto de la carbenoxolona (50 mg/kg; 1 dosis/día) no alcanza a ser significativo, tal vez debido a la dispersión en la respuesta de los individuos experimentales.

El efecto del **M** sobre la resolución de la **UG**, a 20 días de administración consecutiva de 100 mg/kg, tanto en la modalidad **A**) como en la **B**), fue favorecer el proceso de resolución, en términos de disminución del número y longitud de las úlceras, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre el control negativo al tiempo inicial y el **M**, sin embargo, en la modalidad **B**), se redujo significativamente el tiempo de resolución. Por otra parte, a la dosis de 300 mg/kg del **M** (solo evaluada en la modalidad **B**), además de reducirse el tiempo de resolución también se produjo un incremento significativo, en el efecto resolutorio de la **UG**, en todos los casos.

Imágenes representativas, de la apariencia macroscópica de los estómagos del estudio de resolución de la **UG**, se muestran en la figura 19 con las siguientes observaciones:

En primer lugar se muestra un estómago, normal (S/T) sin ningún tipo de tratamiento, cuya superficie es lisa y presenta las características rugosidades gástricas, al observarse, unos minutos después de extirpado, la zona glandular denota una coloración rosada homogénea.

El resto de las imágenes tiene una apariencia opaca, debido a que permanecieron en contacto con la formalina amortiguada durante un tiempo prolongado.

También se muestra la imagen de un estómago tras 24 h de habersele inducido la formación de **UG** ($t=0$), lo que se considera como el tiempo inicial; dado que en este punto se comenzó con la administración de los tratamientos,

Las úlceras que se observan difieren con respecto a las del modelo de úlcera aguda en que, un día después de la injuria, todas las lesiones necrosantes han perdido su coloración café característico, debido al proceso de exfoliación y del reemplazo del tejido hemorrágico por tejido de granulación, por lo que ahora, se observan como lesiones alargadas profundas blanquecinas.

A continuación se muestran los estómagos tratados, durante 20 días, con los diferentes tratamientos.

Se pueden apreciar los cambios, tan notables, entre los estómagos tratados con el **M** (300 mg/kg; 2 dosis/día) y con carbenoxolona (50 mg/kg; 2 dosis/día) comparados con el control (t= 0).

La superficie, de la zona glandular, denota una mejor continuidad del epitelio, con un número casi imperceptible de lesiones.

Para los tratamientos **M** (100 mg/kg; 1 dosis/día) y **M** (100 mg/kg; 2 dosis/día) se aprecia un efecto resolutorio intermedio, entre los mejores tratamientos y el control (t= 0), mientras que para carbenoxolona (50 mg/kg; 1 dosis/día) y el control negativo, tras 20 días de la inducción de las lesiones (20-C-), las lesiones se redujeron en muy pequeña proporción con respecto a t=0.

7.2.1.3.1- Análisis histopatológico e histoquímico

Previamente, ya se había determinado que el **M** sólo induce producción de moco neutro, pero no de moco ácido, y que la tinción de APS nos permite visualizar, en la misma imagen, tanto la integridad y arquitectura tisular como la presencia de infiltrado inflamatorio, además de la presencia de moco neutro.

Por lo que el análisis microscópico, del proceso resolutorio de la **UG** con los diferentes tratamientos, se realizó empleando solamente preparaciones histológicas con tinción de APS.

El análisis de las imágenes, por microscopía de campo claro (figuras 20 - 26), se muestra de la siguiente manera:

En el cuadrante superior izquierdo (A), se ubica la imagen panorámica, del tejido a un aumento de 200X.

El cuadrante superior derecho (B) e inferior izquierdo (C) corresponden a magnificaciones (630X) de la imagen panorámica.

El primero para analizar la presencia de moco neutro (color fucsia intenso) y continuidad del epitelio gástrico, y

El segundo para determinar la presencia de infiltrado inflamatorio, edema y arquitectura glandular.

El cuadrante inferior derecho es el detalle, de las observaciones histopatológicas e histoquímicas.

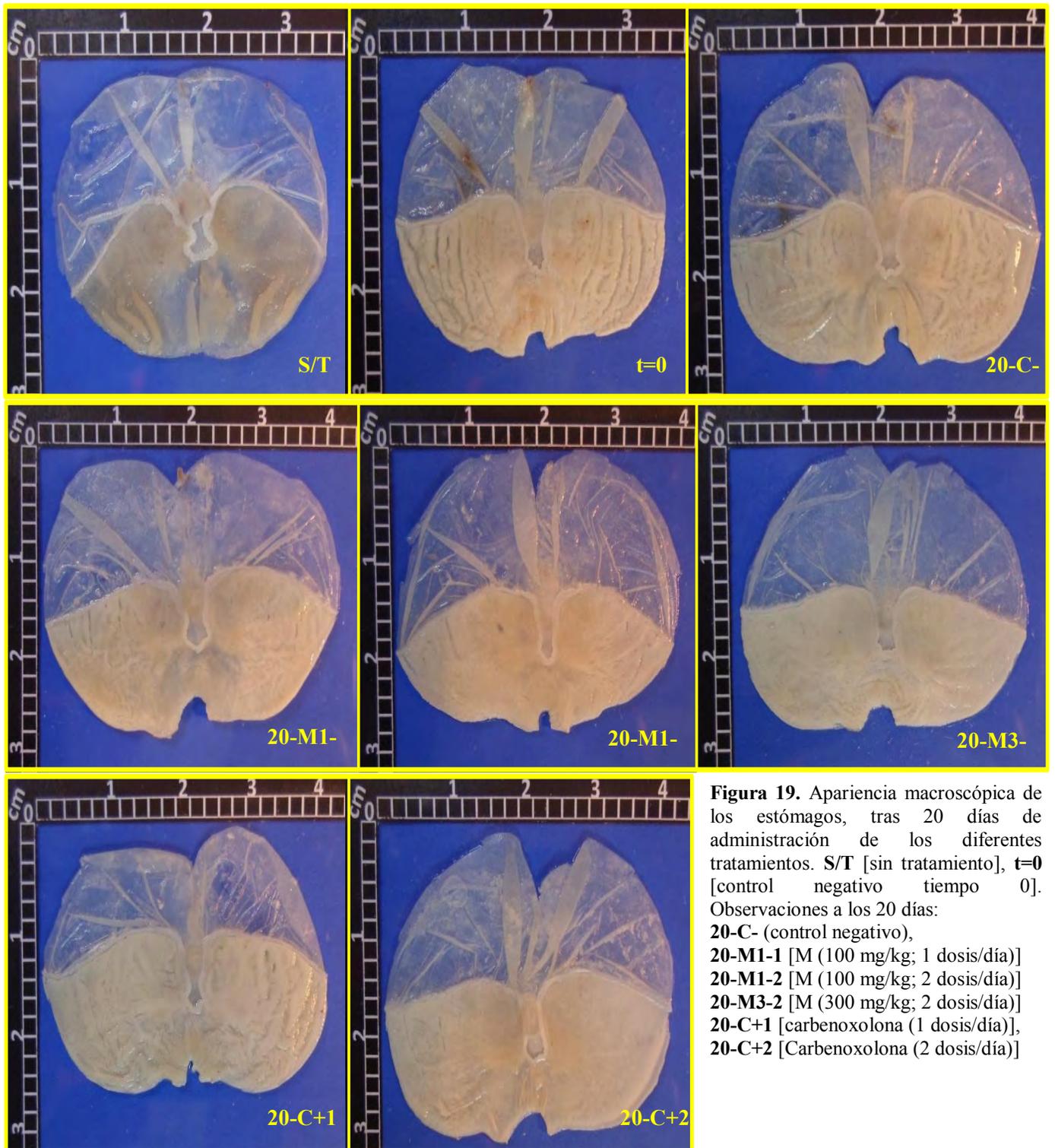


Figura 19. Apariencia macroscópica de los estómagos, tras 20 días de administración de los diferentes tratamientos. S/T [sin tratamiento], t=0 [control negativo tiempo 0]. Observaciones a los 20 días:
20-C- (control negativo),
20-M1-1 [M (100 mg/kg; 1 dosis/día)]
20-M1-2 [M (100 mg/kg; 2 dosis/día)]
20-M3-2 [M (300 mg/kg; 2 dosis/día)]
20-C+1 [carbenoxolona (1 dosis/día)],
20-C+2 [Carbenoxolona (2 dosis/día)]

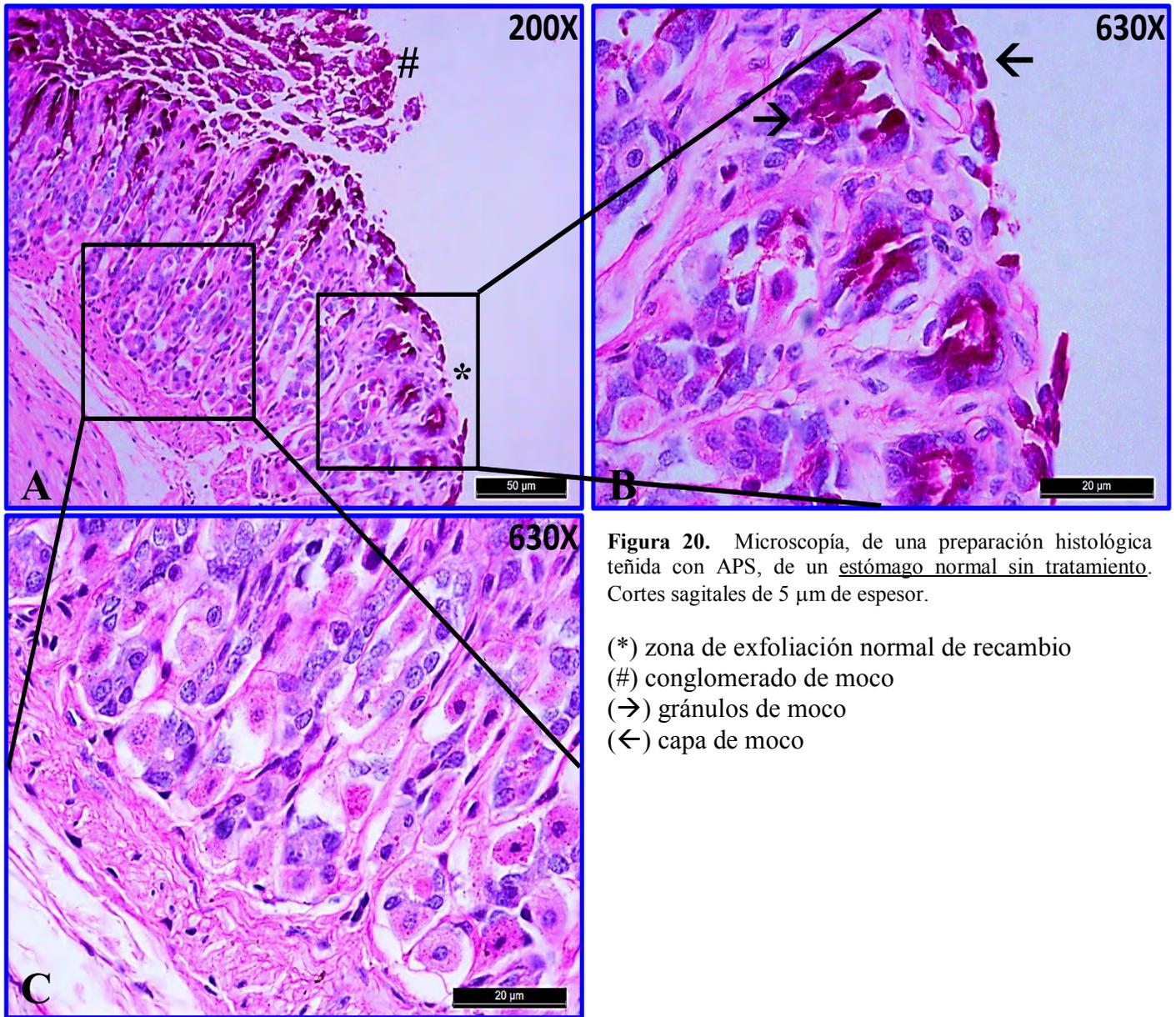


Figura 20. Microscopía, de una preparación histológica teñida con APS, de un estómago normal sin tratamiento. Cortes sagitales de 5 μ m de espesor.

- (*) zona de exfoliación normal de recambio
- (#) conglomerado de moco
- (→) gránulos de moco
- (←) capa de moco

En la figura 20: en (A) se observa continuidad, casi al 100 %, en el epitelio de la mucosa gástrica, con una pequeña zona de exfoliación normal de recambio (*), la arquitectura tisular general es buena y en la región superior izquierda se ubica un conglomerado de moco (#). En (B) se pueden apreciar las células mucosas, del cuello, produciendo una cantidad moderada de gránulos de moco (→), dado que el individuo no recibió ningún estímulo que incite una producción de moco superior a la basal, sobre el epitelio, también se observa una delgada capa de moco (←). En (C), la constitución glandular de la mucosa gástrica es ordenada y bien definida, no se aprecia presencia de infiltrado inflamatorio o edema, ni hiperchromasia.

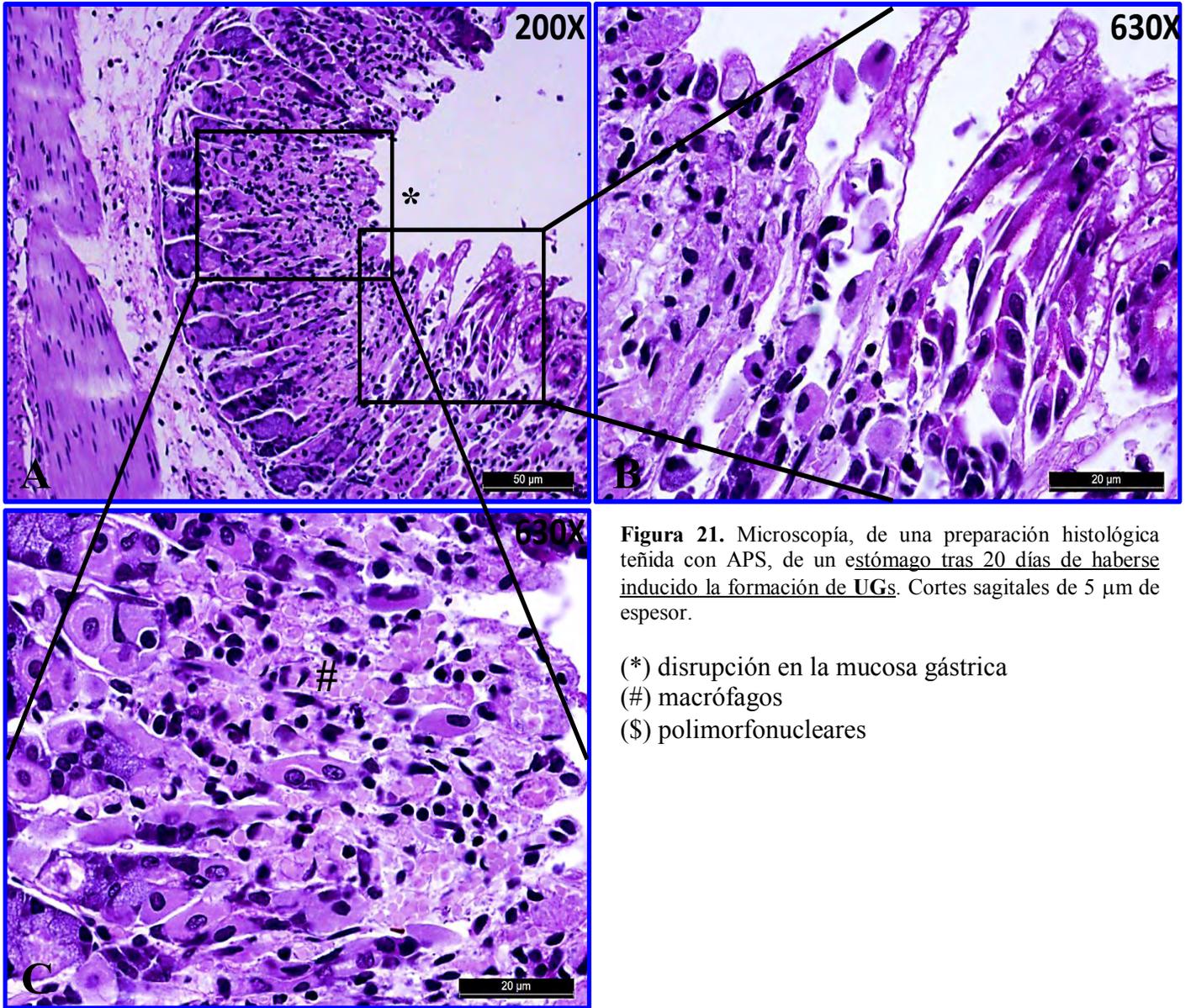


Figura 21. Microscopía, de una preparación histológica teñida con APS, de un estómago tras 20 días de haberse inducido la formación de UGs. Cortes sagitales de 5 µm de espesor.

- (*) disrupción en la mucosa gástrica
- (#) macrófagos
- (\$) polimorfonucleares

En la figura 21: en (A) se observa disrupción, en la continuidad de la mucosa gástrica, invadiendo la lámina propia (*), el tejido, en general, presenta una fuerte hiperchromasia por basofilia (color morado), debido a la abundante presencia de células inflamatorias y al entorno ácido, la arquitectura tisular, en general, se observa alterada y no se aprecia moco en el lumen. En (B) no se aprecian células mucosas ni gránulos de moco debido a la profundidad de la lesión, la ausencia de epitelio, en la zona, indica exposición continua a la pepsina y al ácido gástrico, por lo que no se pudo establecer un buen proceso de resolución. En (C) se observa abundante presencia de infiltrado inflamatorio, conformado por macrófagos (#) y polimorfonucleares (\$), con pérdida de la arquitectura y definición tisular.

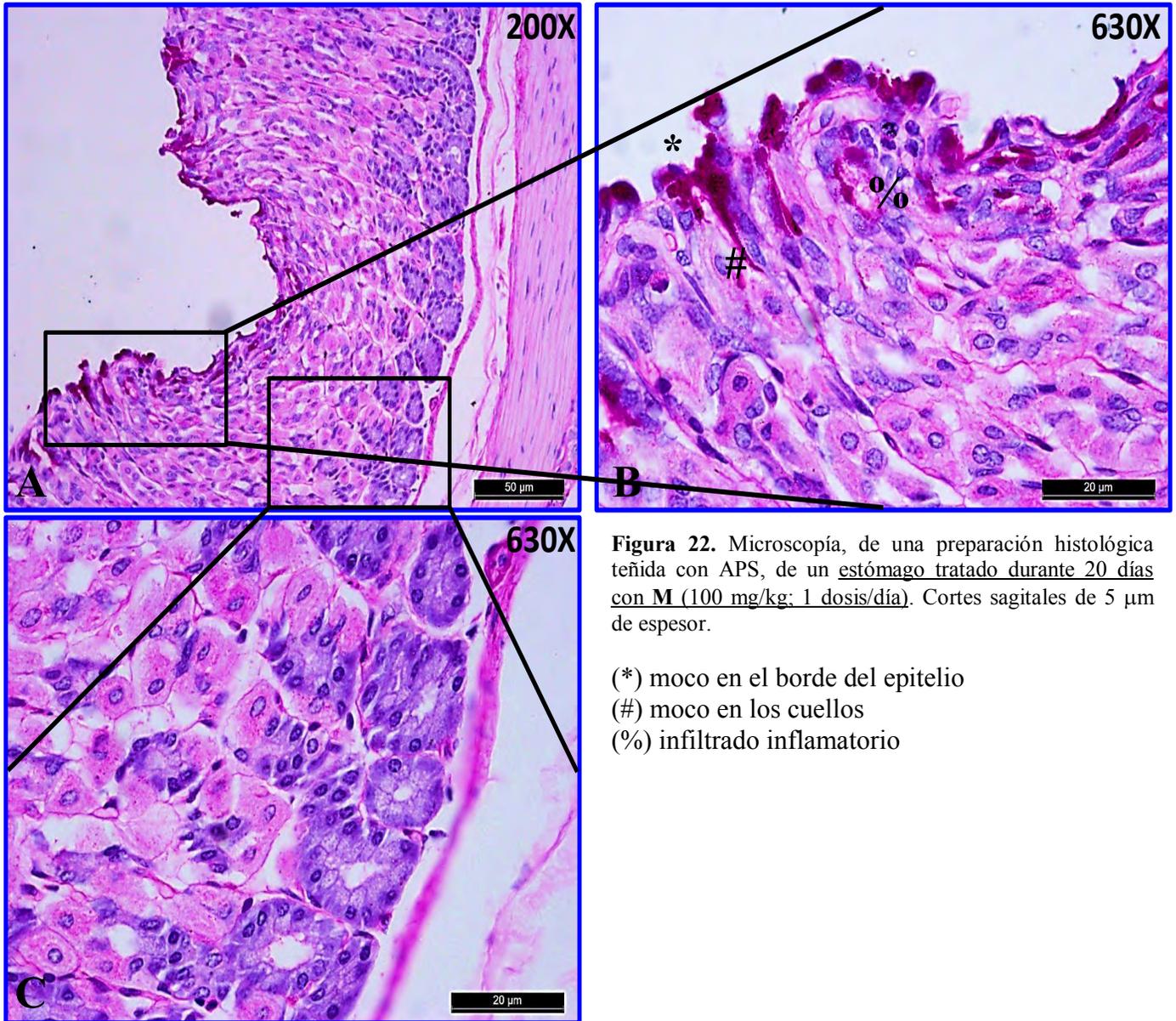


Figura 22. Microscopía, de una preparación histológica teñida con APS, de un estómago tratado durante 20 días con M (100 mg/kg; 1 dosis/día). Cortes sagitales de 5 µm de espesor.

- (*) moco en el borde del epitelio
- (#) moco en los cuellos
- (%) infiltrado inflamatorio

En la figura 22: en (A) se observa lesión profunda que alcanza la lámina propia pero con bordes bien definidos y recubierta por una capa de moco. La arquitectura tisular, en general, se observa con alteraciones. Tanto en la base como en los bordes de la **UG** no se aprecia moco en el lumen. En (B), se aprecia presencia moderada, de moco, en el borde del epitelio (*) y en los cuellos (#), y una pequeña zona de infiltrado inflamatorio (%) en el borde de la **UG**. En (C) la constitución glandular de la zona basal de la mucosa es buena, con definición celular nítida y con afinidad cromática adecuada. No se observa presencia de células inflamatorias, ni de edema infiltrante. En suma, las observaciones sugieren un proceso de resolución con protección mucosa de la zona dañada y abatimiento del proceso inflamatorio, sin embargo, la remodelación de la base de la **UG**, aún está en proceso.

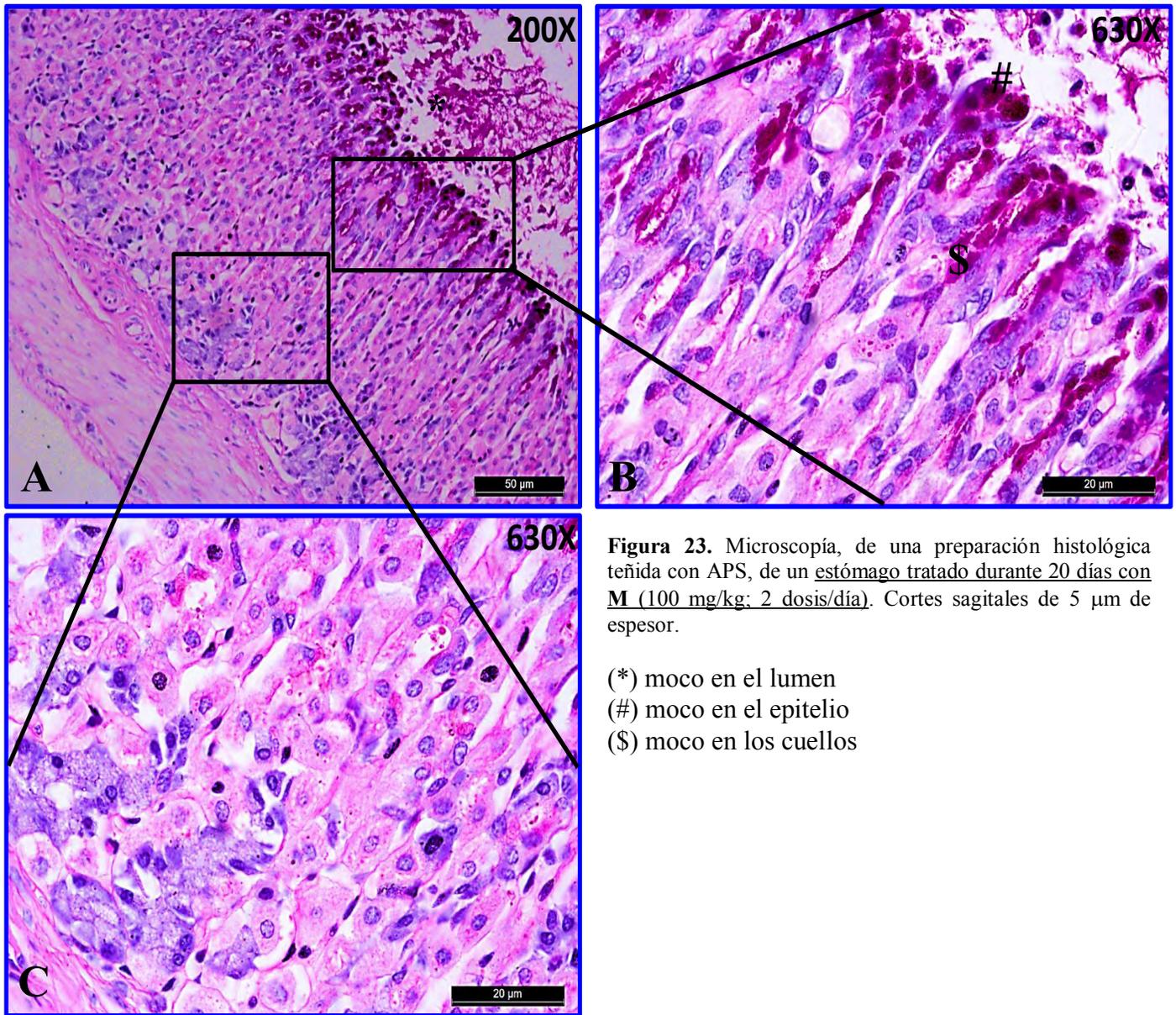


Figura 23. Microscopía, de una preparación histológica teñida con APS, de un estómago tratado durante 20 días con M (100 mg/kg; 2 dosis/día). Cortes sagitales de 5 µm de espesor.

- (*) moco en el lumen
- (#) moco en el epitelio
- (§) moco en los cuellos

En la figura 23: en (A), en el borde del epitelio se aprecia continuidad y elevación homogénea, no se observa lesión invasiva y la arquitectura tisular en general se observa estructurada, además se aprecia moco en el lumen (*). En (B) hay una notable presencia de moco, tanto en el epitelio (#) como en los cuellos (§). En (C) se aprecia buena constitución glandular de la zona basal de la mucosa, la definición celular es nítida y tiene afinidad cromática adecuada, no se observa presencia de células inflamatorias o de edema infiltrante. Las observaciones sugieren un proceso de resolución, con protección mucosa de la zona dañada y abatimiento del proceso inflamatorio, con actividad más efectiva que con M (100 mg/kg; 1 dosis/día), sugiriendo que, la administración de dos dosis al día incrementa la producción de moco, a los niveles adecuados, para permitir un proceso de resolución con una remodelación más rápida y de mejor calidad.

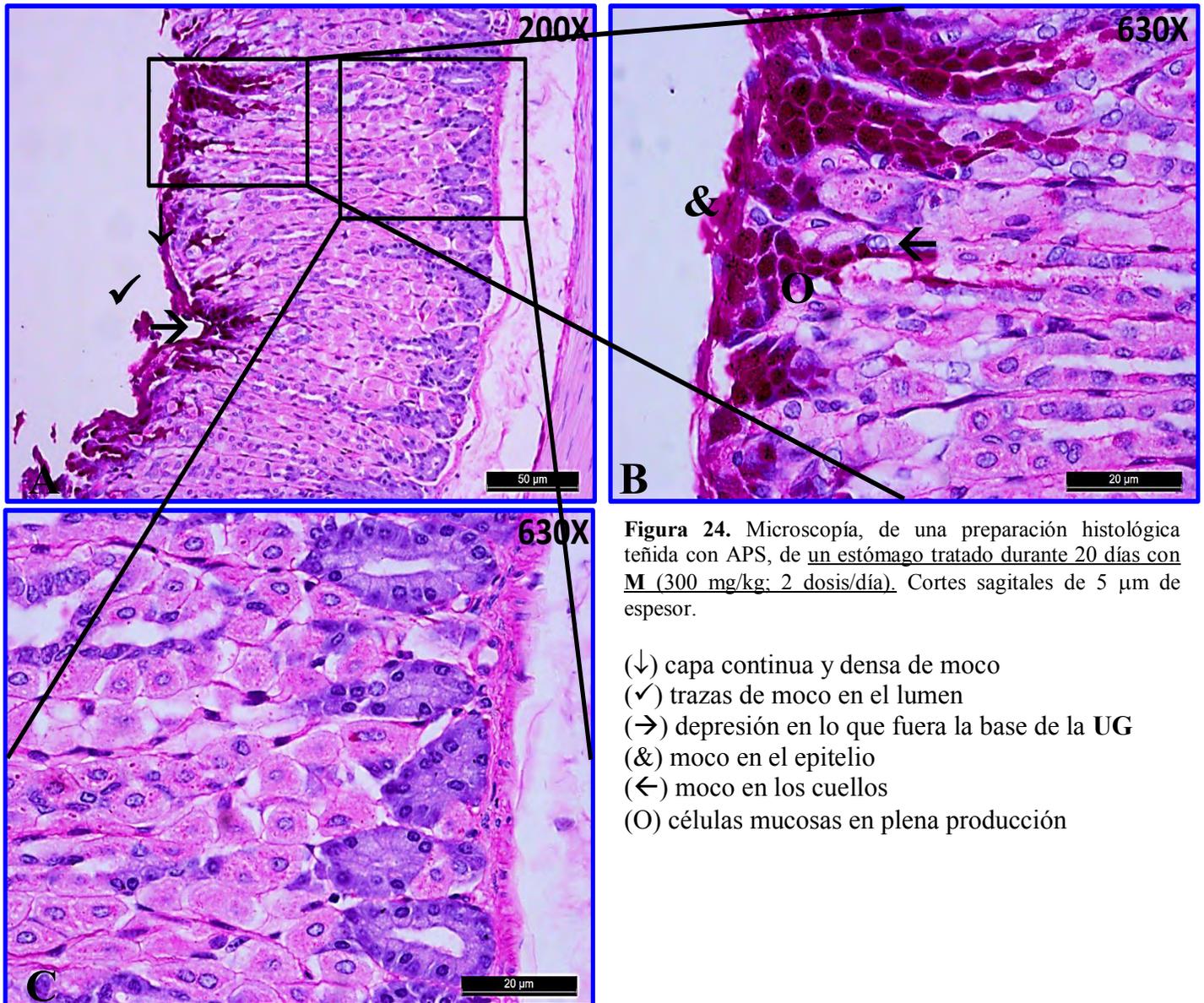


Figura 24. Microscopía, de una preparación histológica teñida con APS, de un estómago tratado durante 20 días con M (300 mg/kg; 2 dosis/día). Cortes sagitales de 5 μ m de espesor.

- (↓) capa continua y densa de moco
- (✓) trazas de moco en el lumen
- (→) depresión en lo que fuera la base de la UG
- (&) moco en el epitelio
- (←) moco en los cuellos
- (O) células mucosas en plena producción

En la figura 24: en (A), la arquitectura tisular, en general, se observa estructurada y recubierta con una capa continua y densa de moco (↓), así como trazas del mismo en el lumen (✓), la elevación es casi homogénea, con una ligera depresión en lo que fuera la base de la UG (→). En (B) hay una notable presencia de moco, tanto en el epitelio (&) como en los cuellos (←) y se dibujan perfectamente las células mucosas en plena producción (O). En (C) se aprecia buena constitución glandular de la zona basal de la mucosa, la definición celular es tan nítida, que se aprecia la luz de las glándulas perfectamente delineada por el conjunto de células principales, la afinidad cromática es adecuada y no se observa presencia de células inflamatorias o de edema infiltrante. El análisis evidencia que, la administración del M (300 mg/kg; 2 dosis/día) incrementa drásticamente la producción de moco, permitiendo un proceso de resolución de la UG con una remodelación, más rápida y de mejor calidad, conferida tanto por el efecto protector del moco contra los factores agresivos endógenos, como por la disminución de la respuesta inflamatoria, favoreciendo el proceso de remodelación tisular.

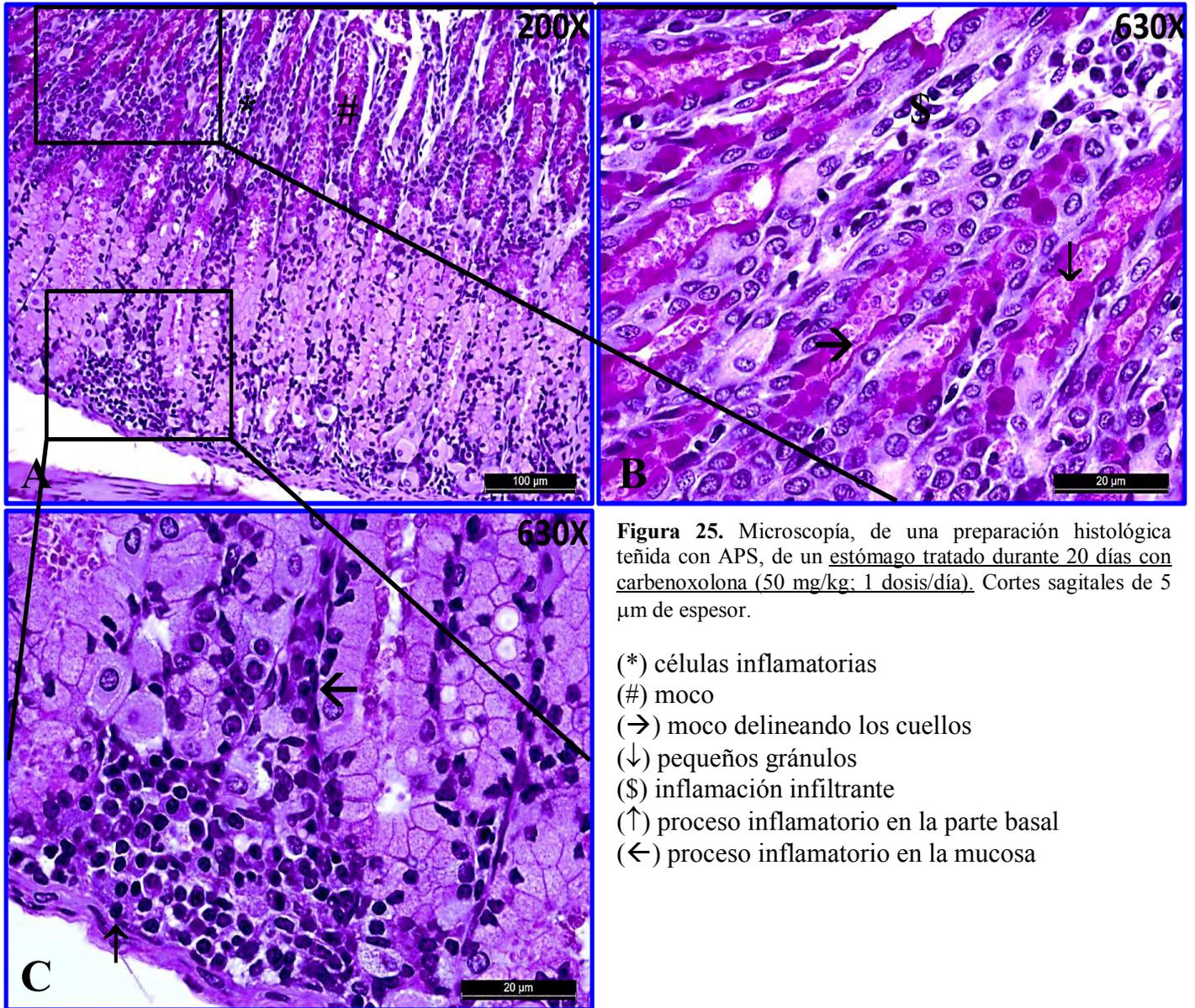


Figura 25. Microscopía, de una preparación histológica teñida con APS, de un estómago tratado durante 20 días con carboxolona (50 mg/kg; 1 dosis/día). Cortes sagitales de 5 μm de espesor.

- (*) células inflamatorias
- (#) moco
- (→) moco delineando los cuellos
- (↓) pequeños gránulos
- (\$) inflamación infiltrante
- (↑) proceso inflamatorio en la parte basal
- (←) proceso inflamatorio en la mucosa

En la figura 25: en (A) se observa el epitelio elevado, sin embargo, la organización estructural de la mucosa gástrica no es buena. Panorámicamente hay hiperchromasia moderada y fuerte presencia de células inflamatorias (*), así como una elevada proporción desordenada de moco (#) en lugar de estar recubriendo el epitelio. En (B) se aprecia fuerte presencia de moco delineando los cuellos (→) y al interior de los mismos se observan pequeños gránulos (↓), toda la zona se observa con inflamación infiltrante (\$). En (C), la constitución glandular se ve alterada, debido principalmente al fuerte proceso inflamatorio en la parte basal (↑) y a lo largo de toda la mucosa (←). El análisis sugiere que el proceso de resolución es desorganizado, lo que se refleja en la baja calidad en la remodelación de la UG, debido principalmente a que el cuadro inflamatorio impide una evolución adecuada del proceso, esto a pesar de la fuerte presencia de moco.

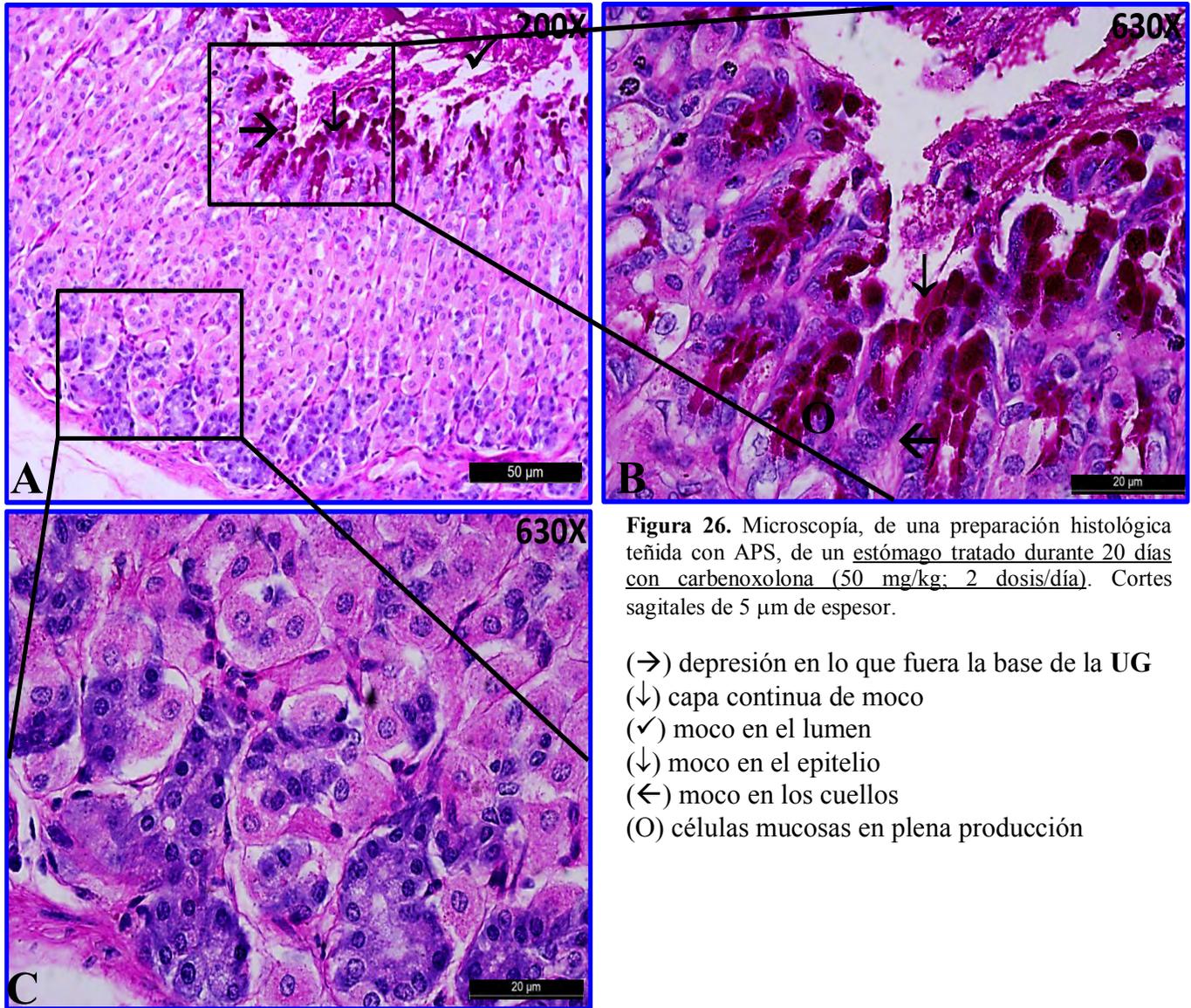


Figura 26. Microscopía, de una preparación histológica teñida con APS, de un estómago tratado durante 20 días con carbenoxolona (50 mg/kg; 2 dosis/día). Cortes sagitales de 5 µm de espesor.

- (→) depresión en lo que fuera la base de la UG
- (↓) capa continua de moco
- (✓) moco en el lumen
- (↓) moco en el epitelio
- (←) moco en los cuellos
- (O) células mucosas en plena producción

En la figura 26: en (A), la arquitectura tisular en general se observa estructurada, con una elevación casi homogénea, con una ligera depresión en lo que fuera la base de la UG (→) y recubierta con una capa continua de moco (↓), y presencia del mismo en el lumen (✓). En (B) hay una notable presencia de moco, tanto en el epitelio (↓) como en los cuellos (←) y se dibujan perfectamente las células mucosas en plena producción (O). En (C) se aprecia buena constitución glandular de la zona basal de la mucosa, la definición celular es nítida, la afinidad cromática es adecuada y no se observa presencia de células inflamatorias o de edema infiltrante. El análisis evidencia que, la administración de carbenoxolona (50 mg/kg; 2 dosis/día), en comparación con la dosis de 50 mg/kg; 1 dosis/día incrementa significativamente la producción de moco, permitiendo un proceso de resolución de UG con una remodelación más rápida y de mejor calidad, conferida tanto por el efecto protector del moco contra los factores agresivos endógenos, como por la disminución de la respuesta inflamatoria, favoreciendo el proceso de remodelación tisular. Lo que indica la necesidad de dosis repetidas de carbenoxolona para alcanzar el efecto resolutorio.

Es necesario considerar el conjunto, de varios factores, para determinar si un tratamiento tiene un buen efecto resolutorio. Por un lado es importante reducir el tiempo en que se alcanza una resolución significativa, y por otro mejorar la calidad de cada una de las etapas involucradas (granulación, cicatrización y remodelación).

Para el caso del presente estudio se cuenta con: datos de porcentaje de resolución de **UG**, observaciones macroscópicas, análisis histoquímico e histopatológico y la previa determinación del posible mecanismo de acción. Las correlaciones entre todas estas variables, tras veinte días de administración de cada uno de los tratamientos, indican lo siguiente:

Control negativo (SSI): La resolución, en términos de índice de úlcera, alcanza a ser significativa estadísticamente hasta el día 20, sin embargo, numéricamente no es una reducción destacable, lo cual se correlaciona con la apariencia macroscópica, pero sobre todo se ve reflejado en la condición tisular, donde las alteraciones continúan siendo muy notorias, la resolución no denota una buena calidad y además, la ausencia de moco neutro pone de manifiesto su importante papel, para favorecer el efecto resolutorio y la remodelación. Por otro lado, la persistencia, del fuerte infiltrado inflamatorio crónico, es otro factor, importantísimo, para que la resolución no se presente de manera adecuada. La correlación, de todos los parámetros analizados, es consistente.

Para M (100 mg/kg; 1 dosis/día): El efecto resolutorio tiene significancia estadística a partir del día 15, reduciendo el tiempo con respecto al control negativo. Este efecto positivo se sostiene al día 20, y es consistente con el efecto macroscópico encontrado. Las observaciones histopatológicas también reflejan una mejoría acorde, la cual aparentemente es conferida por la presencia de moco neutro y la reducción del cuadro inflamatorio, lo que se asocia con la participación directa de las prostaglandinas, las cuales incrementan la producción de moco y bicarbonato, y con la presencia de niveles adecuados de óxido nítrico, favoreciendo la angiogénesis, y una buena vascularización con el concomitante aporte de oxígeno y nutrientes.

Para M (100 mg/kg; 2 dosis/día): El efecto resolutorio tiene significancia estadística a partir del día 10, y se incrementa paulatinamente hasta el día 20, reduciendo el tiempo en 10 días con respecto al control negativo y con respecto a **M (100 mg/kg; 1 dosis/día)** en 5 días. El efecto de resolución macroscópico se hace más notable y es consistente con los porcentajes de resolución determinados. Las observaciones histopatológicas también reflejan una mejoría congruente, y se justifica por una presencia mayor de moco neutro con respecto a **M (100 mg/kg; 1 dosis/día)** y la reducción del cuadro inflamatorio, lo que histológicamente se refleja en una mejor remodelación de la mucosa.

Para M (300 mg/kg; 2 dosis/día): El efecto resolutorio se hace presente a partir del día cinco, con un elevado nivel de significancia estadística a partir del día 10, y se incrementa paulatinamente hasta el día 20, reduciendo el tiempo en 15 días, con respecto al control negativo, y en 10 y 5 días en comparación con **M 100 mg/kg; 1 dosis/día** y **100 mg/kg; 2 dosis/día**, respectivamente. El efecto resolutorio, a nivel macroscópico, es muy destacable y consistente con la reducción del índice de úlcera. Las observaciones histopatológicas son una fuerte evidencia del efecto, dependiente de la dosis y

sostenimiento de la misma, lo que se traduce en un incremento elevado en la producción de moco y la reducción del infiltrado inflamatorio, mostrando una mejor remodelación y reflejando una buena restauración de las función, tanto a nivel celular, como en el órgano *per se*.

Para carbenoxolona (50 mg/kg; 1 dosis/día): El efecto resolutorio nunca es significativo, a lo largo del estudio, lo que a nivel macroscópico es consistente. A pesar de la alta producción de moco, la persistencia del infiltrado inflamatorio no permite que el índice de úlcera disminuya a lo largo del tiempo. Lo que indica que, tanto la producción de moco como la reducción del proceso, inflamatorio, son vitales para reducir el tiempo de resolución y favorecer la calidad de la misma.

Para carbenoxolona (50 mg/kg; 2 dosis/día): En contraste, el hecho de duplicar la dosis, de manera fraccionada, permite alcanzar una resolución significativa en tan sólo 5 días, con un efecto sostenido hasta el día 20. Lo que es evidente a nivel macroscópico e histológico. Es probable que, bajo este esquema de administración, se alcance la dosis efectiva o bien, un efecto sostenido que reduce el cuadro inflamatorio. La suma de este efecto más la presencia de moco neutro, ahora sí tienen un efecto positivo, favoreciendo la resolución de la **UG**. Lo que confirma que es necesaria la combinación, entre producción de moco y disminución del infiltrado inflamatorio para observar un efecto favorable.

En los tres casos, donde se administró el **M**, se detectó una mejor resolución de la **UG** con respecto al control negativo, los diferentes grados, de significancia y de restauración, tienen correlación directa con la dosis y la frecuencia de la misma. El principal efecto del **M**, detectado en esta evaluación, fue la asociación entre los niveles de producción de moco y la calidad de la restauración de la mucosa gástrica, lo que se asocia con la participación directa de las prostaglandinas, las cuales se sabe incrementan la producción de moco y bicarbonato, y con la presencia de niveles adecuados de óxido nítrico, favoreciendo la angiogénesis, y una buena vascularización, con el concomitante aporte de oxígeno, y nutrientes en el sitio de la lesión durante todas las etapas de la resolución.

Por otro lado, la reducción del infiltrado inflamatorio se observa a partir de la dosis más baja evaluada, por lo que sería recomendable determinar el tipo de efecto que ejerce el **M** directamente sobre la mucosa gástrica. Es importante determinar esto ya que, durante la fase 1 de este estudio y bajo el modelo de edema agudo inducido por ATF en oreja de ratón, se determinó que el **M**, bajo administración tópica, posee solo una moderada actividad antiinflamatoria. Este resultado, podría deberse a que la alta polaridad del **M** impide su penetración efectiva a través de la piel, y por lo tanto su efecto antiinflamatorio no es detectable mediante este modelo; o que actúe por una vía diferente a la que se puede determinar mediante ese modelo.

Es posible que el efecto obtenido, sobre la mucosa gástrica en el experimento de resolución de úlcera, sea más claro debido a que **M** se administró por vía intragástrica. El ambiente ácido podría favorecer la hidrólisis de algunas moléculas, lo que incrementa su actividad, o bien el entorno gástrico en sí le confiere algún tipo de actividad, que solamente ahí se puede detectar.

7.2.2.- Resultados referentes al H:

7.2.2.1.- Obtención de cantidad considerable de H

A partir de 5.9 kg de corteza se obtuvieron 44 g del **H**, lo que equivale al 0.7 % de rendimiento en peso seco.

A este extracto se le determinó su CMI frente a *H. pylori*, la cual fue de 15.6 µg/mL, valor ligeramente mayor con respecto a la CMI del **H** obtenido en la primera parte de la Tesis (7.8 µg/mL), posiblemente debido a deficiencias, en la extracción, al procesar una gran cantidad de corteza.

7.2.2.2.- Actividad bactericida de H

La actividad bactericida del **H** se determinó, mediante el método de dilución en placa, obteniendo un valor de CMB= 66 µg/mL (cuatro veces el valor de MIC), en un tiempo de 36 h.

Sin embargo, la actividad bactericida mejora con una concentración de 99 µg/mL (seis veces el valor de MIC), ya que el tiempo de inhibición se reduce a 24 h. Concentraciones inferiores a 66 y mayores a 2.5 µg/mL solamente ejercen un efecto bacteriostático (figura 27).

7.2.2.3.- Fraccionamiento biodirigido por la actividad anti-*H. pylori* de H

Inicialmente, **H** (42 g = 0.7 %) y CMI= 15.6 µg/mL, se partitionaron mediante extracción líquido-líquido (Hx:MeOH 1:1), generando las fracciones primarias **Fx-Hx** (1.4 g = 0.58 %) y **Fx-MeOH** (36 g = 85.71 %), con valores de CMI (µg/mL) de 15.6 y 7.8, respectivamente, con un incremento en la actividad anti-*H. pylori* de la **Fx-MeOH**.

Posteriormente, 36 g de **Fx-MeOH** fueron sometidos a cromatografía, en columna abierta (CCA) de sílica gel, obteniéndose 10 fracciones secundarias (nomenclatura **I → X**), de las cuales la fracción **V**, (4.6 g = 12.9 %) y CMI= 31.2 µg/mL, se seleccionó con base en su rendimiento y actividad, si bien la actividad disminuyó, con respecto a **Fx-MeOH**, el rendimiento indicaba la posibilidad de disminuir la complejidad, y obtener cantidades necesarias para realizar los pasos subsiguientes de purificación.

La fracción **V** fue sometida a CCA, generando seis fracciones terciarias (nomenclatura **V1 → V6**), donde **V2** resultó ser la mayoritaria (4.44 g = 96.3 %) con un mejor valor de CMI (15.6 µg/mL) con respecto a la fracción **V**. El aspecto de **V2** es: oleoso, amarillo, inodoro y soluble en cloroformo.

V2 nuevamente se fraccionó sin embargo, de aquí de adelante, ya no se siguió el criterio biodirigido sino más bien, el rendimiento. A partir de 3.93 g de **V2** se obtuvieron cinco fracciones principales (nomenclatura **F1 → F5**), donde la **F3** fue la mayoritaria (1.73 g = 44.02 %).

El fraccionamiento de 1.73 g **F3** generó cuatro fracciones (nomenclatura **F3.A** → **F3.D**), de las cuales la **F3.B** fue la mayoritaria (827.7 = 47.84 %).

El fraccionamiento de **F3.B** permitió la separación de cuatro subfracciones (nomenclatura **F3.B.1** → **F3.B.4**), identificándose **F3.B.4** como mayoritaria (719.2 = 86.89 %). Adicionalmente, debido a la similitud cromatográfica, 87.7 mg de **F3.B.3** se purificaron hasta obtener el mismo perfil que para **F3.B.4**.

Finalmente, 719.2 mg de la subfracción **F3.B.4** se purificaron, el resultado fue la obtención de (417 mg = 9.39 %) de un aceite incoloro (nomenclatura **MEZ**), a la cual posteriormente se le determinó una CMI = 3.9 µg/mL, y una CMB = 15.6 µg/mL (figura 28), superando la actividad del metronidazol (CMB = 300 µg/mL), el cual se empleó como antibiótico de referencia.

El rendimiento de 417 mg **MEZ**, con respecto a la cantidad de corteza empleada (5.9 kg), es del 0.0070 %, mientras que, con respecto a 42 g del **H**, es del 0.99 %, considerándose como rendimientos bajos.

La elucidación estructural de **MEZ** aún está en proceso, sin embargo, los análisis preliminares de los espectros de RMN de ¹H indican que se trata de una mezcla de compuestos.

Por otro lado, también se aisló una mezcla de β-sitosterol y estigmasterol (proporción 80:20 respectivamente), identificada certeramente por RMN de ¹H y de ¹³C (apéndice B).

La CMI de esta mezcla resultó ser de 62.5 µg/mL. Si bien, estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en plantas y sus estructuras se conocen desde hace mucho tiempo, en cuanto a su actividad anti-*H. pylori*, este es el primer reporte.

El fraccionamiento biodirigido del **H**, mediante varias cromatografías sucesivas en columna abierta de sílica gel y otros métodos de separación, no solo culminó con el aislamiento de **MEZ** con una mejor actividad inhibitoria con respecto al extracto, sino que también permitió reducir la complejidad metabólica de varias fracciones (datos no mostrados) las cuales, en muchos casos, son muy activas (CMI entre los 0.95 y 62.5 µg/mL).

Si bien, en algunos casos, el rendimiento de las mismas es muy bajo, ya se tienen detectadas algunas fracciones que pudieran ser sujetas a más procesos de purificación y que seguramente permitirían la obtención de otros compuestos.

Probablemente el destacable efecto anti-*H. pylori* del **H**, a nivel extracto, es conferido por el sinergismo de varios compuestos, que aparentemente se encuentran en muy baja proporción.

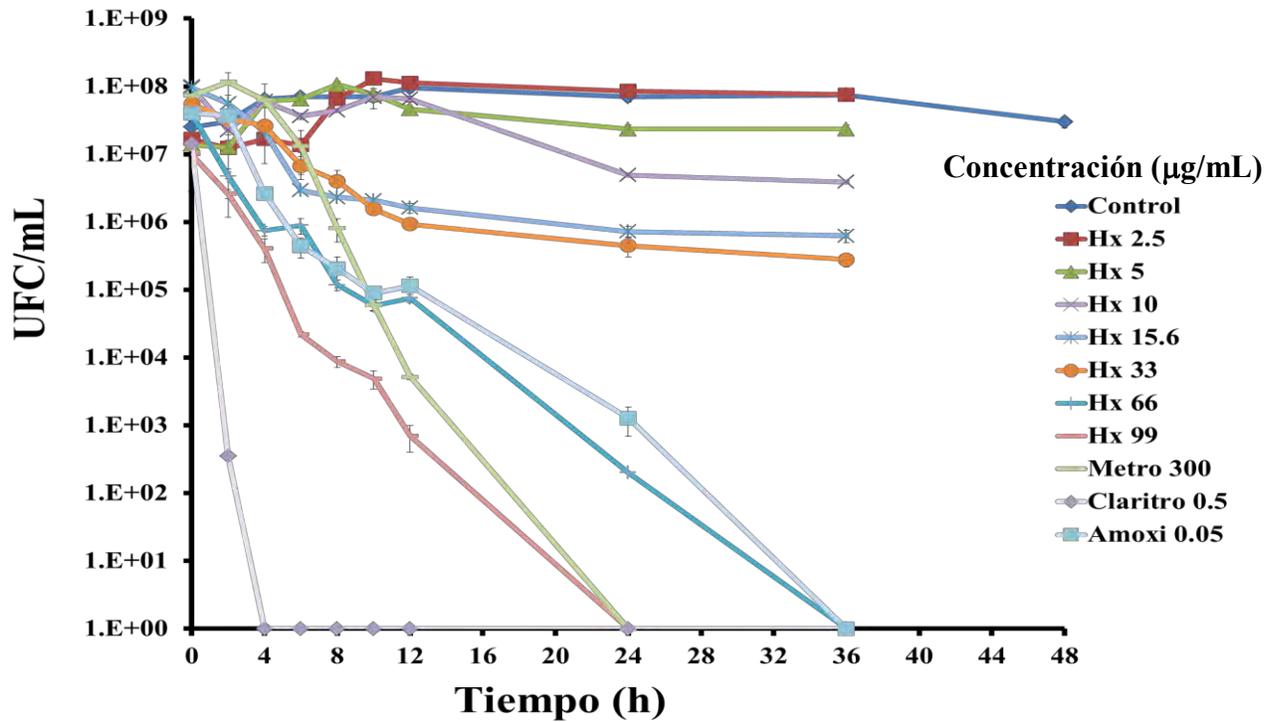


Figura 27. Actividad bactericida del H y de los antibióticos de referencia. Cada curva representa el promedio de tres réplicas independientes por triplicado \pm EEM. (Metro= metronidazol; Claritro= claritromicina; Amoxi= amoxicilina).

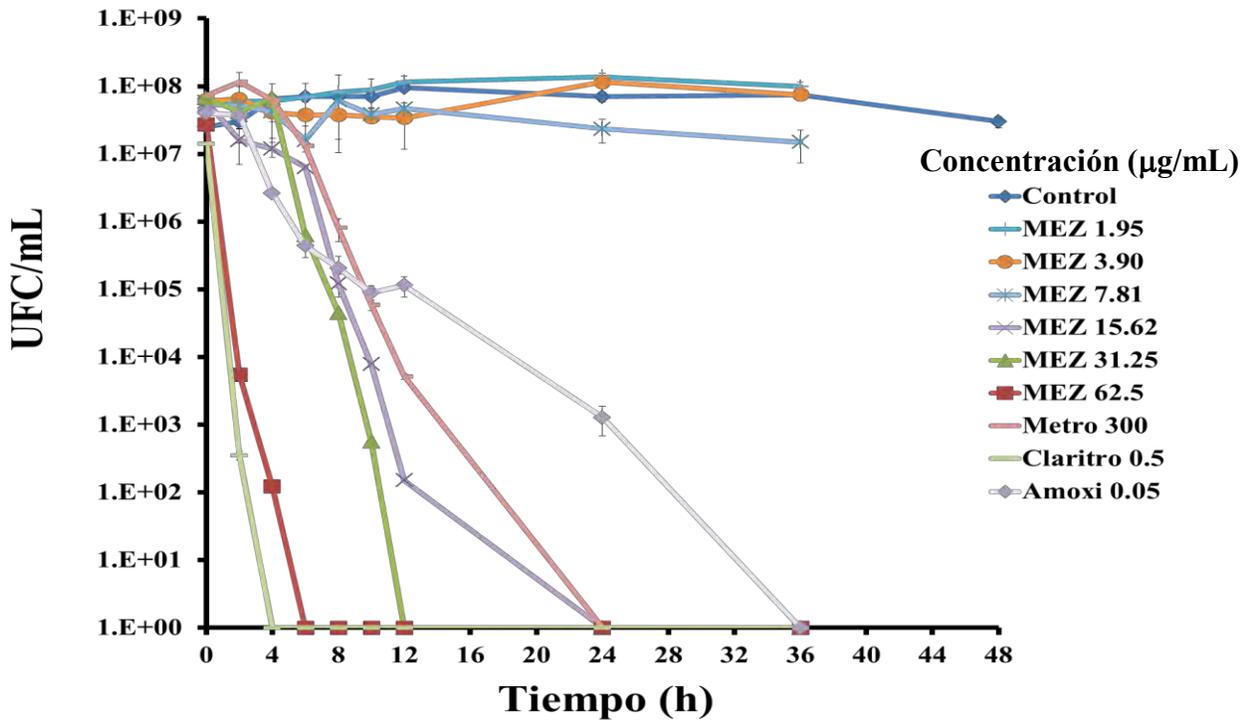


Figura 28. Actividad bactericida de MEZ y de los antibióticos de referencia. Cada curva representa el promedio de tres réplicas independientes por triplicado \pm EEM. (MEZ= mezcla de ácidos grasos ciclopropil y ciclopropiliden carboxílicos); Metro= metronidazol; Claritro= claritromicina; Amoxi= amoxicilina)

8.- CONCLUSIONES

El estudio, de los cuatro extractos **H**, **D**, **D-M** y **M** de *C. procera*, permitió determinar que:

Cyrtocarpa procera sí posee actividades anti-*H. pylori*, gastroprotectora y antiinflamatoria, y además no produce toxicidad bajo administración aguda. Lo anterior quedó demostrado por el notable efecto anti-*H. pylori*, y antiinflamatorio del **H**, así como la destacable actividad gastroprotectora del **M**.

El fraccionamiento biodirigido del **H**, por la actividad anti-*H. pylori*, permitió:

La identificación de una mezcla, de compuestos, con actividad bactericida sobre la bacteria.

El estudio del mecanismo de gastroprotección, y el efecto resolutorio del **M** sobre la **UG** mostró que:

El mecanismo gastroprotector de **M** se relaciona, principalmente, con el papel del óxido nítrico y las prostaglandinas, pero también se asocia, parcialmente, a la participación de grupos sulhidrilo no proteicos y canales de potasio dependientes de ATP.

La **UG** presenta una mejoría significativa, gracias al efecto resolutorio del **M**, tras su administración continua durante 20 días.

De manera conjunta, para *C. procera*:

La gastroprotección, mediada por óxido nítrico y prostaglandinas, del **M** y su efecto resolutorio sobre la úlcera gástrica; así como la actividad anti-*H. pylori* del **H** y de la mezcla activa identificada, demostrados en este trabajo de tesis, destacan su potencial preclínico.

Lo anterior permite reconocerla como candidata prometedora para el desarrollo de un tratamiento integral, para la gastritis o úlcera péptica, relacionados o no con *H. pylori*.

También cabe destacar la posibilidad de considerarla, como componente coadyuvante, dentro de las terapias anti-*H. pylori* con miras a incrementar la tolerancia y apego a las mismas.

También puede ser considerada, como una fuente importante, para la obtención de compuestos o bien moléculas líder, que puedan ser empleados en el tratamiento de enfermedades en las que *H. pylori* sea el agente etiológico.

Por otro lado, el presente trabajo contribuye con el conocimiento, etnofarmacológico, de esta especie y respalda, en cierta medida, su uso tradicional en la etnomedicina Mexicana.

9.- PERSPECTIVAS

Todo el trabajo mencionado sirve, como antecedente, para plantear las siguientes perspectivas:

Del **H**:

- Determinar si el (o los) compuesto(s) aislado(s) a partir del **H** tienen efecto anti-*H. pylori*, en un modelo de infección *in vivo*, bajo diferentes modalidades de tratamiento.
- Estudiar el mecanismo de acción de dicho(s) compuesto(s) sobre *H. pylori*.
- Evaluar si tiene algún efecto sobre los factores de virulencia de la bacteria.
- Adicionalmente, dependiendo del tipo y disponibilidad del(los) compuesto(s), evaluar su actividad gastroprotectora y antiinflamatoria.
- Otro tipo de estudio sería generar derivados, de este compuesto, y evaluar el impacto de las modificaciones sobre su actividad inhibitoria.

Del **M**:

- Evaluar la inocuidad y efectividad del **M** en otros modelos, toxicológicos y farmacológicos, de resolución de **UG** así como su efecto resolutorio en la úlcera gástrica de etiología bacteriana.
- Caracterizar fitoquímicamente al **M**, mediante la identificación de un compuesto marcador de la calidad, para realizar estudios de estabilidad.
- Determinar si la reducción del infiltrado inflamatorio, en la mucosa gástrica en el modelo de resolución de la **UG**, se relaciona con la inhibición de la quimiotaxis de células inflamatorias al sitio de la lesión.

Cyrtocarpa procera podría emplearse en el tratamiento integral de las enfermedades asociadas a *H. pylori*.

10.- APÉNDICE A

10.1.- Generalidades del estómago

10.1.1.- Anatomía, histología y fisiología del estómago

El estómago se define como: la parte expandida del tubo digestivo, que se encuentra entre el esófago y el intestino delgado. En él se almacenan, transitoriamente, los alimentos ingeridos y su función principal es la digestión enzimática, su contenido ácido permite reducir la carga bacteriana ingerida. Anatómicamente, el estómago se divide en cuatro regiones, cardias, fondo, cuerpo y antro (figura 29): Cardias: es la porción que rodea la abertura superior del estómago, a través de la cual los alimentos, provenientes del esófago, ingresan. Fondo o fundus: comprende la parte superior del estómago. Cuerpo: abarca la mayor parte del estómago y está flanqueada por el fondo y el antro. Antro: es la última porción del estómago y lo conecta con el duodeno a través del píloro. El píloro, por su parte, es un esfínter, que se encuentra en el límite entre el estómago y el duodeno, que controla la salida del contenido gástrico (Moore, *et al.*, 2010).

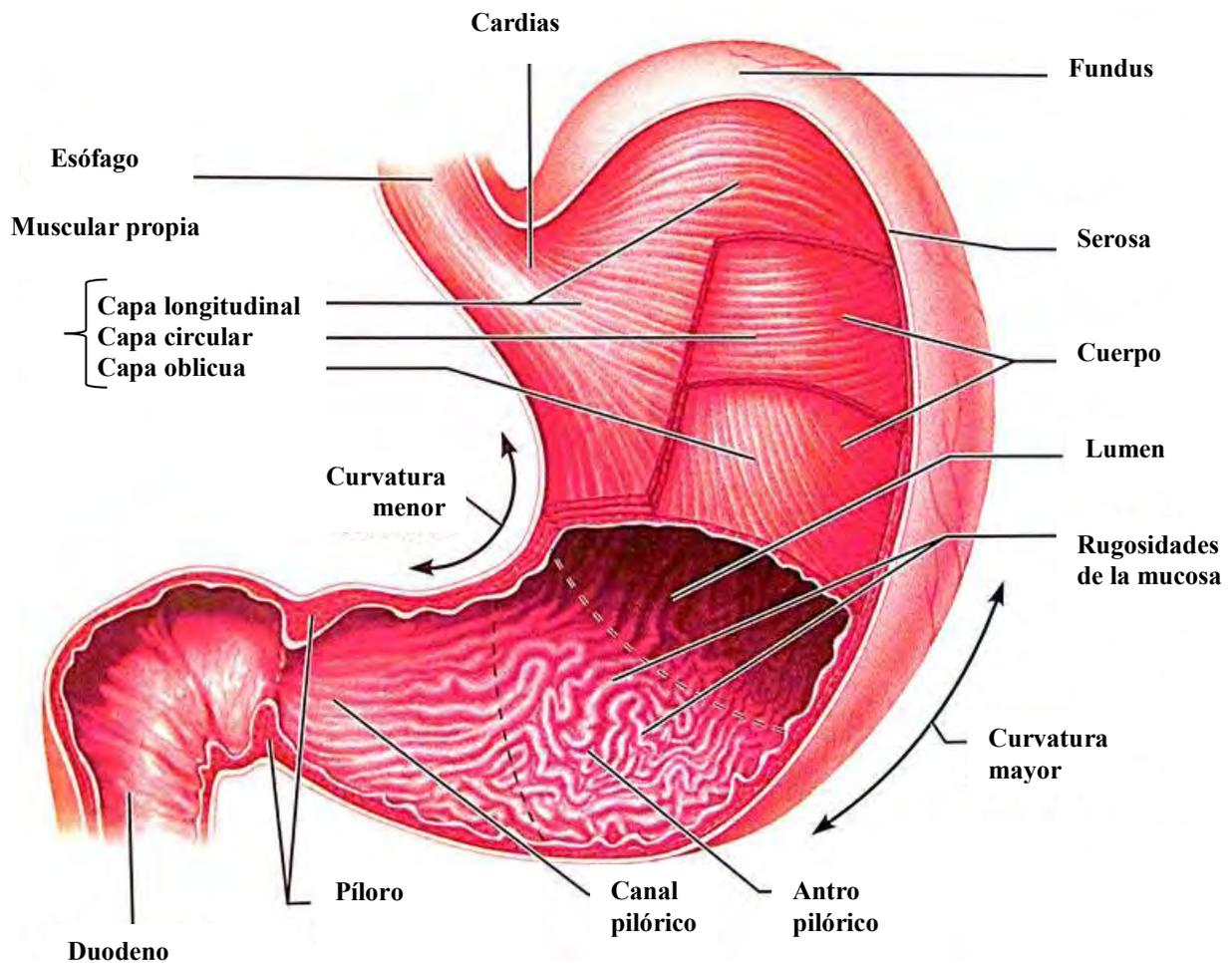


Figura 29. Regionalización anatómica del estómago.

La estructura histológica del estómago se conforma por cinco capas distintas (figura 30): Serosa: es la capa más superficial, se compone de tejido conectivo laxo y rodea a todo el estómago. Muscular propia: genera las contracciones que favorecen el tránsito de los alimentos. Submucosa: se compone de tejido conectivo denso y contiene los vasos sanguíneos linfáticos y terminaciones nerviosas. Muscularis mucosae: reviste de tejido muscular a la mucosa. Mucosa: es la capa que está rodeando la luz gástrica y se divide a su vez en dos subcapas: el epitelio superficial, que tiene la función de proteger contra agentes agresivos y la lámina propia, que contiene glándulas secretoras (Moore, *et al.*, 2010).

El epitelio superficial, en el interior del estómago, está constituido solamente de células destinadas a producir una densa capa de moco, que protege toda la superficie de la mucosa gástrica, su estructura forma pliegues en la luz del estómago denominados fosas gástricas, dentro de las cuales se encuentran diferentes tipos de células gástricas, que secretan diversos productos hacia la luz del estómago (Barrett, *et al.*, 2010; Marieb y Hoehn, 2010). Las células que conforman las glándulas del cardias y el píloro son principalmente productoras de moco. En las glándulas, que se sitúan en el antro, se encuentran células productoras de moco y gastrina, principalmente. En la zona del cuerpo y el fondo del estómago se produce la mayor cantidad de secreciones gástricas, entre ellas una gran cantidad de ácido clorhídrico (Marieb y Hoehn, 2010).

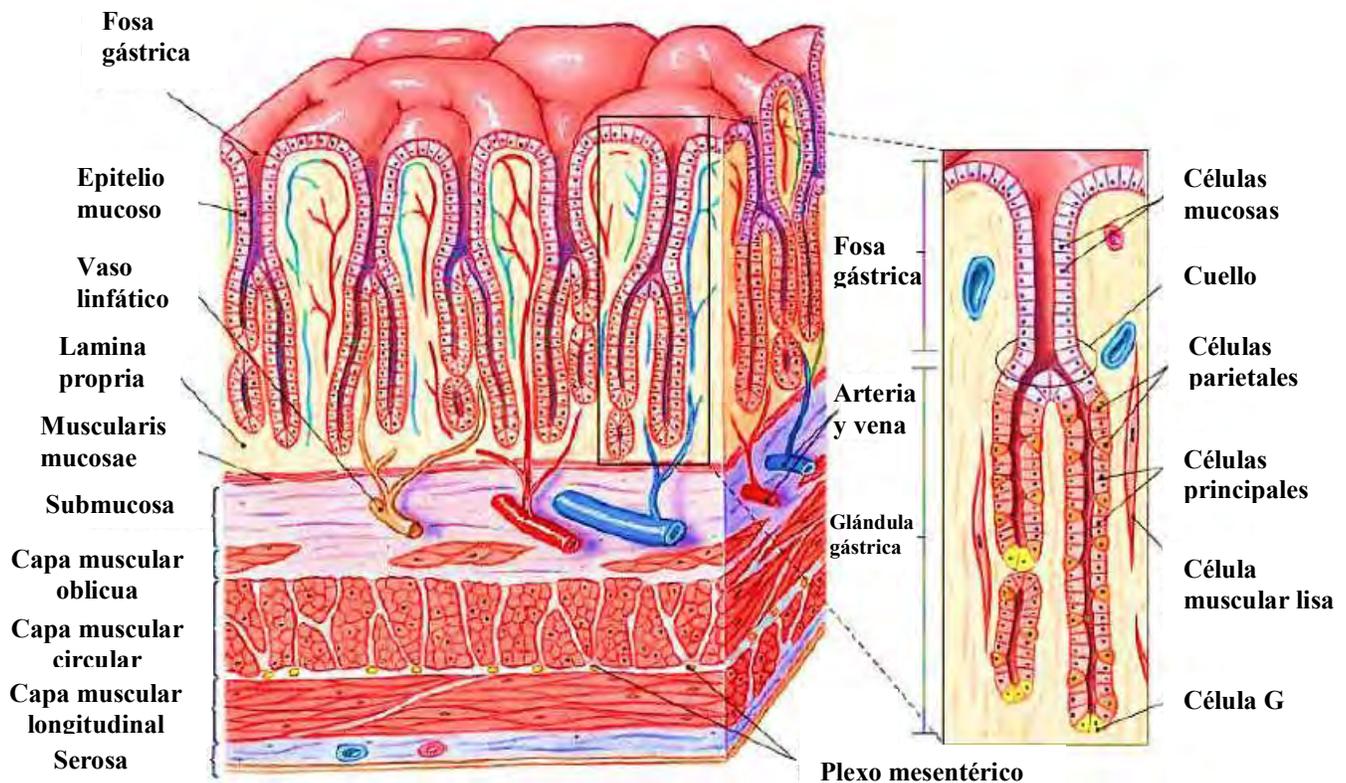


Figura 30. Estructura histológica y constitución celular de la mucosa gástrica.

Las glándulas gástricas se constituyen por diferentes tipos celulares (figura 31): Células mucosas del cuello: se encuentran en el cuello de las glándulas y secretan moco soluble. Células mucosas superficiales: generan moco insoluble. Células parietales:

secretan ácido clorhídrico y factor intrínseco. Células principales: secretan pepsinógeno, el cual es una forma inactiva de la pepsina, y se activa en presencia de ácido clorhídrico. Células del tipo enterocromafines: liberan mensajeros químicos hacia el fluido intersticial de la lámina propia, como son la histamina, que activa la secreción de ácido clorhídrico por las células parietales, y la serotonina, que provoca contracciones en la musculatura del estómago. Células G: secretan gastrina, que es una hormona que estimula la secreción del ácido gástrico, y que llega hacia el torrente sanguíneo. Células D: secretan somatostatina, hormona que inhibe la liberación de histamina y gastrina, que en consecuencia, inhibe la secreción de ácido gástrico (Fox, 2011; Marieb y Hoehn, 2010).

10.1.2.- Secreciones gástricas

Dentro del estómago se genera una gran cantidad de secreciones gástricas, que preparan al organismo para la digestión y una buena asimilación de los nutrientes. Estas secreciones gástricas son producidas y liberadas por las glándulas de la mucosa gástrica, generándose principalmente moco y bicarbonato, con el propósito de proteger al estómago de las secreciones, tanto propias como de agentes agresivos externos, tales como los alimentos, fármacos y microorganismos. Entre las secreciones glandulares más características, en la fisiología normal del estómago, se encuentran el ácido clorhídrico, factor intrínseco, pepsinógeno y la lipasa gástrica, todas ellas asociadas a la digestión. La ingesta de alimentos activa la secreción del ácido hacia la luz del estómago y comienza la hidrólisis de macromoléculas de los alimentos, además el factor intrínseco ayuda en la absorción de la vitamina B12; el pepsinógeno, precursor de la pepsina, comienza con la digestión de proteínas y la lipasa con la de los triacilglicéridos (Barrett, *et al.*, 2010; Waldman y Terzic, 2010).

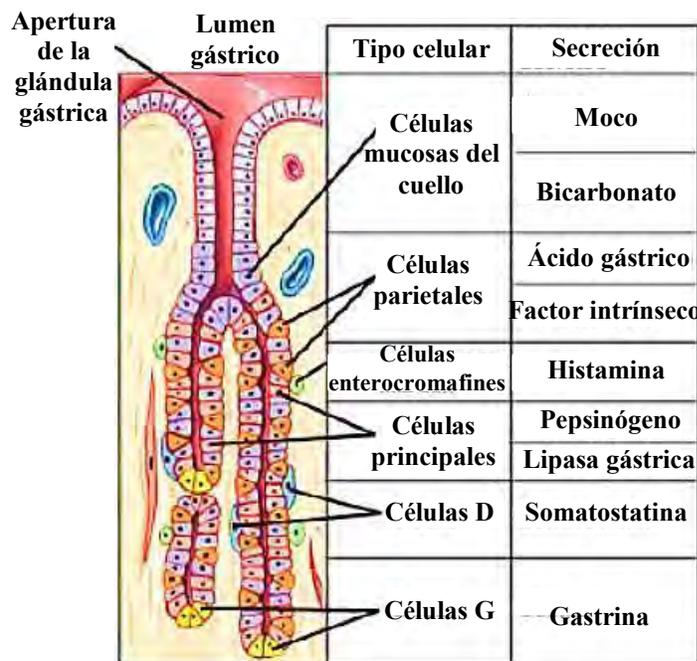


Figura 31. Constitución celular y secreciones de la mucosa gástrica.

10.1.3.- *Mecanismos de defensa de la mucosa gástrica*

Para que la mucosa gástrica pueda resistir los agentes nocivos, con los que está en contacto cotidianamente, como son los alimentos y sustancias ingeridas, así como las secreciones endógenas del estómago, dispone de una serie de mecanismos que la protegen de la variada y frecuente exposición a estos agentes, con diversas características como: pH, osmolaridad y temperatura, así como propiedades detergentes y carga bacteriana. En caso de que estos factores de protección no consigan mantener la homeostasis de la mucosa, también existen mecanismos para poder repararla (Ham y Kauntz, 2007; Wallace y Granger, 1996).

Entre los factores, que protegen la mucosa gástrica de los agentes injuriantes y la autodigestión, se encuentran principalmente la secreción de moco gástrico y de bicarbonato, la barrera epitelial, la estimulación de fibras nerviosas, la síntesis de prostaglandinas, citocinas y un adecuado flujo sanguíneo de la mucosa. Se considera que la síntesis de prostaglandinas, en particular PGE₂, es uno de los mecanismos de gastroprotección más importantes, debido a que su efecto se basa en intensificar los factores de defensa propios de la mucosa gástrica. (Luo *et al.*, 2008; Ham y Kauntz, 2007; Kumar, *et al.*, 2005, Miller, 1983). Además de que, las prostaglandinas, también juegan un papel importante dentro de la resolución de las úlceras (Konturek, 2005). PGE₂ promueve la angiogénesis, y se ha reportado que también podría promover la proliferación y la migración de las células epiteliales, con lo que contribuye a la regeneración de las zonas ulceradas en la mucosa (Hatazawa, 2007).

El óxido nítrico (NO) endógeno, también tiene un papel importante dentro del mantenimiento de la integridad del epitelio gástrico (Whittle, *et al.*, 1990). Induce un efecto gastroprotector, debido a que regula el flujo sanguíneo, estimula la síntesis de prostaglandinas (Matsuda, 1999), reduce la secreción ácida (Kitamura, *et al.*, 1999), y modula la liberación de moco gástrico (Brown, *et al.*, 1992). Cuando se presenta una lesión, en la mucosa gástrica, juega un papel importante en el mantenimiento del flujo sanguíneo y la angiogénesis del tejido de granulación, por lo que es un factor indispensable en la resolución de las úlceras gástricas (Konturek, *et al.*, 1993).

La acumulación de especies reactivas de oxígeno (EROS) daña la mucosa gástrica y duodenal, debido a que su mecanismo de acción incluye la lipoperoxidación (que destruye las membranas celulares), la alteración del metabolismo celular y el daño al ADN, por lo que están implicadas en el desarrollo y la recurrencia de úlceras pépticas. El secuestro de EROS favorece el proceso resolutivo de las úlceras y reduce la recurrencia de ulceración (Demir, *et al.*, 2003; Salim, 1994).

Los canales de potasio, dependientes de ATP, se encuentran en las células musculares vasculares y median la vasodilatación, inducida por el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), en varios tipos de músculo liso vascular. El CGRP media una hiperemia protectora, sobre la estimulación de las terminales de los nervios aferentes primarios en la mucosa gástrica. Los bloqueadores de los canales de potasio dependientes de ATP exacerban la injuria de la mucosa gástrica, mediante el impedimento del proceso hiperémico, mediado por vía neural en la mucosa gástrica (Iwata *et al.*, 1997).

11.- APÉNDICE B

11.1.- Aislamiento e identificación de la mezcla de β -sitosterol y estigmasterol

A continuación se muestra el proceso seguido para el aislamiento de la mezcla de β -sitosterol y estigmasterol (Figura 32). Posteriormente se hace mención de las características de RMN del producto obtenido.

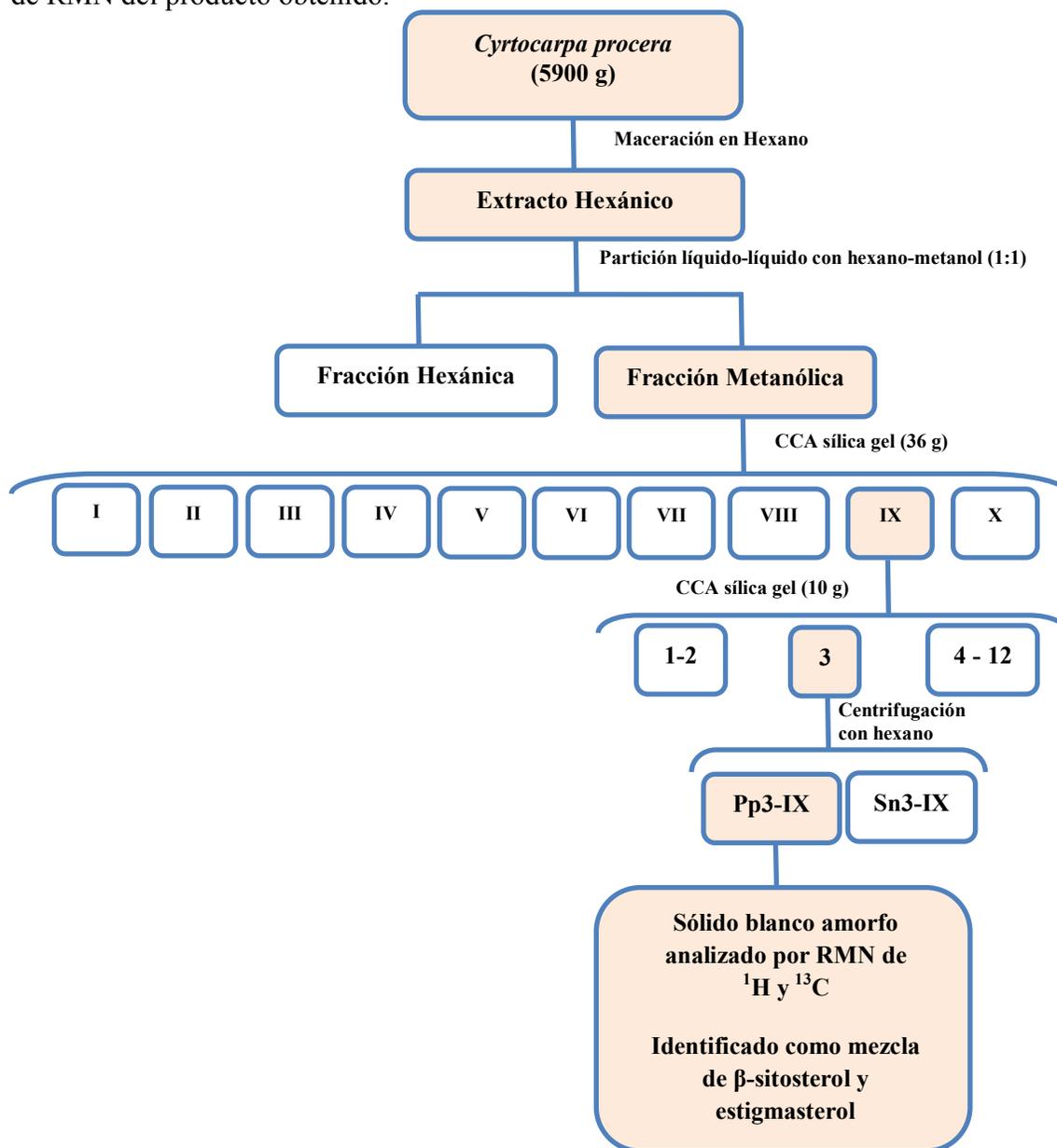


Figura 32. Aislamiento de la mezcla de β -sitosterol y estigmasterol a partir del extracto hexánico de *C. procera*. Donde CCA: cromatografía en columna abierta, Sn: sobrenadante, Pp: precipitado.

El análisis de las constantes espectroscópicas de RMN ^1H y ^{13}C permitió determinar la presencia de la mezcla de β -sitosterol y estigmasterol en una proporción 87.93:12.07, respectivamente, los desplazamientos químicos se corroboraron con la literatura reportada (Arjun *et al.*, 2010; Patheh *et al.*, 2009).

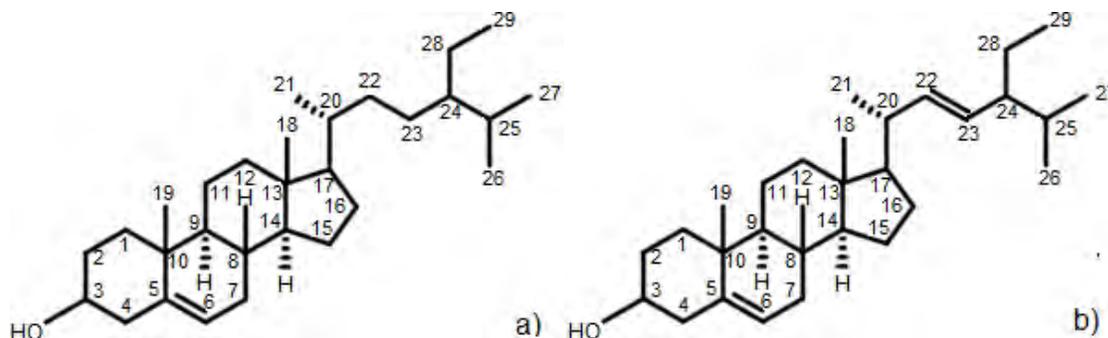


Figura 33. Estructuras químicas del β -sitosterol (a) y del estigmasterol (b).

a) β -Sitosterol

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 5.35 (dt, 2H, 5.4, 1.9, H-5), 3.52 (tdd, 2H, 11.1, 5.3, 4.0, H-3), 1.01 (s, 6H, H-29), 0.92 (d, 6H, 6.6, H-19), 0.84 (t, 6H, 7.4, H-24), 0.83 (d, 6H, 7.2, H-26), 0.81 (d, 6H, 7.2, H-27), 0.68 (s, 6H, H-28).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ 37.24 (C-1), 31.64 (C-2), 71.79 (C-3), 42.30 (C-4), 140.73 (C-5), 121.69 (C-6), 31.89 (C-7), 31.89 (C-8), 50.12 (C-9), 36.49 (C-10), 21.07 (C-11), 39.76 (C-12), 42.31 (C-13), 56.75 (C-14), 24.29 (C-15), 28.24 (C-16), 56.04 (C-17), 36.13 (C-18), 19.02 (C-19), 33.93 (C-20), 26.07 (C-21), 45.82 (C-22), 23.06 (C-23), 11.97 (C-24), 29.14 (C-25), 19.81 (C-26), 19.38 (C-27), 18.77 (C-28), 11.85 (C-29).

b) Estigmasterol

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 5.35 (dt, 2H, 5.4, 1.9, H-5), 5.15 (dd, 1H, 15.1, 8.6, H-21), 5.01 (dd, 1H, 15.2, 8.6, H-20), 3.52 (tdd, 2H, 11.1, 5.3, 4.0, H-3), 1.01 (s, 6H, H-29), 0.92 (d, 6H, 6.6, H-19), 0.84 (t, 6H, 7.4, H-24), 0.83 (d, 6H, 7.2, H-26), 0.81 (d, 6H, 7.2, H-27), 0.68 (s, 6H, H-28).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ 37.24 (C-1), 31.64 (C-2), 71.79 (C-3), 42.30 (C-4), 140.73 (C-5), 121.69 (C-6), 31.89 (C-7), 31.89 (C-8), 50.12 (C-9), 36.49 (C-10), 21.07 (C-11), 39.76 (C-12), 42.31 (C-13), 56.75 (C-14), 24.29 (C-15), 28.24 (C-16), 56.04 (C-17), 36.13 (C-18), 19.02 (C-19), 33.93 (C-20), 26.07 (C-21), 45.82 (C-22), 23.06 (C-23), 11.97 (C-24), 29.14 (C-25), 19.81 (C-26), 19.38 (C-27), 18.77 (C-28), 11.85 (C-29).

12.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A

- Allen, L.A., Schlesinger, L.S., Kang, B. (2000). Virulent strains of *Helicobacter pylori* demonstrate delayed phagocytosis and stimulate homotypic phagosome fusion in macrophages. *The Journal of Experimental Medicine* 191: 115–128.
- Allison, M., Bergman, T., Gerszten, E. (1999). Further studies on fecal parasites in antiquity. *American Journal of Clinical Pathology* 112; 5: 595-596.
- Andersen-Nissen, E., Smith, K.D., Strobe, K.L. (2005). Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 10: 9247–9252.
- Andrade, S.F., Lemos, M., Comunello, E., Noldin, V.F., Filho, V.C., Niero, R. (2007). Evaluation of the antiulcerogenic activity of *Maytenus robusta* (Celastraceae) in different experimental ulcer models. *Journal of Ethnopharmacology* 113: 252–257.
- Ankli, A., Heinrich, M., Bork, P., Wolfram, L., Bauerfeind, P., Brun, R., Schmid, C., Weiss, C., Bruggisser, R., Gertsch, J., Wasescha, M., Sticher, O. (2002). Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. *Journal of Ethnopharmacology* 79: 43-52.
- Annuk, H., Hirno, S., Turi, E., Mikelsaar, M., Arak, E., Wadstrom, T. (1999). Effect on cell surface hydrophobicity and susceptibility of *Helicobacter pylori* to medicinal plant extracts. *FEMS Microbiology Letters* 172: 41- 45.
- Argyros, F., Ghosh, M., Huang, L., Masubuchi, N., David, R., Cave, D., Grübel, P. (2000). Evaluation of a PCR Primer Based on the Isocitrate Dehydrogenase Gene for Detection of *Helicobacter pylori* in Feces. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 3755-3758.
- Arjun, P., Jha, S., Murthy, P. N., Manik, A., Sharone, A. (2010). Isolation and characterization of stigmast-5-en-3 β -ol (β -sitosterol) from the leaves of *Hygrophila spinosa* T. *Anders International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 1; 2: 95-100
- Argueta, V., Cano, J., Rodarte, M., (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana, Vol. I, Instituto Nacional Indigenista, México.
- Armenta, R. (2005). Boletín del Instituto de Seguridad Social al Servicio de los Trabajadores. No. 334. México.
- Arvigo, R., Balick, M. (1993). *Rainforest Remedies*, Lotus Press, Twin Lakes.
- Atherton, J.C. (2006). The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastroduodenal diseases. *The 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; Supplement 1: 1-7.

B

- Baron, J. H., 1977. Effect of carbenoxolone sodium on human gastric acid secretion. *Gut* 18: 721-722.
- Barquero, A.A. (2007). Plantas sanadoras: pasado, presente, futuro. *Química viva*. Buenos Aires 2; 6: 53-69.
- Barrett, K.E., Barman, S.B., Boitano, S., Brooks, H.L. 2010. *Ganong Fisiología Médica*. 23ª edición. McGraw- Hill: 429-450.
- Bergonzelli, G.E., Donnicola D., Porta N., Corthesy- Theulaz I.E. (2003). Essential oils as components of a diet-based approach to management of *Helicobacter* infection. *Antimicrobial and Agents Chemotherapy* 47: 3240- 3246.
- Blaser, M.J. (1992). Hypothesis on the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Gastroenterology* 102: 720-727.
- Blaser, M.J. (1997). Not all *Helicobacter pylori* strains are created equal: should all be eliminated?. *The Lancet* 349:1020-1022
- Blaser, M.J. (1998). *Helicobacters* are indigenous to the human stomach: duodenal ulceration is due to changes in gastric microecology in the modern era. *Gut* 43: 721-727.
- Blaser, M.J. (1999). Hypothesis: The changing relationships of *Helicobacter pylori* and humans: implications for health and disease. *The Journal of Infectious Diseases* 179: 1523-1530.

- Blaser, M.J. (2008). Disappearing microbiota: *Helicobacter pylori* protection against esophageal adenocarcinoma. *Cancer Prevention Research*; 1:308–311.
- Boncristiano, M., Paccani, S.R., Barone, S. (2003). The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. *The Journal of Experimental Medicine* 198: 1887–1897.
- Borelli, F., Izzo, A.A. (2000). The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytotherapy research* 14: 581-591.
- Brinckman, J.A. (2009). Fair Trade medicinal plants and extracts. *Market News Service for medicinal Plants and Extracts*. December; 33.
- Brown, J.F., Hanson, P.J., Whittle, B.J.R. (1992). Nitric oxide donors increase mucus gel thickness in rat stomach. *The European Journal of Pharmacology* 223: 103-104.
- Bucciarelli, A., Mancini, M.M., Skliar, M. (2007). Propiedades gastroprotectoras de plantas medicinales. *Estudios fitoquímicos y Farmacológicos*. *Revista de la Asociación Médica de Bahía Blanca* 17; 1:3-9.
- Bucciarelli, A., Skliar, M.I. (2007). Medicinal plants from Argentina with gastroprotective activity. *ARS Pharmaceutica* 48: 361–369.
- Burger, O., Ofek, I., Tabak, M., Weiss, E., Sharon, N., Neeman, I. (2000). A high molecular mass constituent of cranberry juice inhibits *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucus. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 29: 295- 301.
- Burger, O., Weiss, E., Sharon, N., Tabak, M., Neeman, I., Ofek, I. (2002). Inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucus by a high-molecular- weight constituent of cranberry juice. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 42: 279- 284.

C

- Canales, M., Hernández, T., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Avila, G., Duran, A., Lira, R. (2005). Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, Mexico. *Journal of Ethnopharmacology* 97: 429-439.
- Castillo-Juárez, I., Rivero-Cruz, F., Celis, H., Romero, I. (2007). Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology* 114: 72-77.
- Castillo-Juárez, I., Romero, I. (2007). Plantas con actividad Anti- *Helicobacter pylori*: una revisión. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 80: 35-62.
- Castillo-Juarez, I., Gonzalez, V., Jaime-Aguilar, H., Martinez, G., Linares E., Bye, R., Romero, I., (2009). Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology* 122: 402-405.
- Cassel-Beraud, A.M., Le-Jan, J., Mouden, J.C., Andriantsoa, M., Andriantsiferana, R. (1991). Preliminary study of the prevalence of *Helicobacter pylori* in Tananarive, Madagascar and the antibacterial activity *in vitro* of 13 Malagasy medicinal plants on this germ. *Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar* 59; 237: 9-23.
- Chin, Y.W., Balunas, M.J., Chai, H.B., Kinghorn, A.D. (2006). Drug discovery from natural sources. *The AAPS Journal* 8: E239–E253.
- Clardy, J., Walsh, C. (2004). Lessons from natural molecules. *Nature* 432: 829-837.
- Collin, H.A. (2001). Secondary product formation in plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation* 34: 119-134.
- Cover, T.L., Blaser, M.J. (1992). Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *The Journal of Biological Chemistry* 267: 10570–10575.
- Cragg, G.M., Kingston, D.G.I., Newman, D.J. (2005). *Anticancer agents from natural products*. Ed. Taylor & Francis. Florida.

D

- De Francesco, V., Ierardi, E., Hassan, C., Zullo, A. (2012). *Helicobacter pylori* therapy: Present and future. *The World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics* 6; 3(4): 68-73
- Dehesa, V. (1993). Métodos de diagnóstico en infección para *Helicobacter pylori*. *Revista de Gastroenterología de México* 2: 87-95
- Demir, S., Yilmaz, M., Köseoğlu, M., Akalin, N., Aslan, D. (2003). Role of free radicals in peptic ulcer and gastritis. *The Turkish Journal of Gastroenterology* 14: 39-43.

- De-Young, L.M., Kheifets, J.B., Ballaron, S.J., Young J.M., (1989). Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacological agents. *Agents and Action* 26: 335-341.
- Dixon, M. (2001). Pathology of Gastritis and Peptic Ulceration. In H.L.T. Mobley, G.L. Mendz, and S.L. Hazell (eds), *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. ASM press, Washington, D.C. 459-469
- Dore, M.P., Sepúlveda, A.R., El-Zimaity, H., Yamaoka, Y., Osato, M.S., Mototsugu, K., Nieddu, A. M., Realdi, G., Graham, D.Y. (2004). Isolation of *Helicobacter pylori* from sheep-implications for transmission to humans. *The American Journal of Gastroenterology* 96(5): 1396-1401.

E

- Eaton, K.A., Krakowka, S. (1994). Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity* 62: 3604–3607.
- Edwards P.J., Wratten S.D. (1980). Ecology of insect plant-interactions. *Inst. Biol. studies biol.* 121: 43.
- Ernst, P.B., Gold, B.D. (2000). The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *The Annual Review of Microbiology* 54: 615-640.
- Escobedo-Hinojosa, W.I., Díaz del Carpio, J., Palacios-Espinosa, J.F., Romero, I. (2012). Contribution to the ethnopharmacological and anti-*Helicobacter pylori* knowledge of *Cyrtocarpa procera* Kunth (Anacardiaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 143; 1: 363-371.

F

- Feldman, M., Friedman, L. S. y Brandt L. J., 2002. *Sleisenger & Fordtran. Enfermedades gastrointestinales y Hepáticas. Fisiología, diagnóstico y tratamiento. 7ª edición, tomo 1. Editorial Médica Panamericana: 733-827.*
- Fox, S. I., 2011. *Fisiología humana. 12ª Edición. Mc Graw Hill Interamericana editores.*

G

- Gebert, B., Fischer, W., Weiss, R., Hoffmann, R., Haas, R. (2003) *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T-lymphocyte activation. *Science* 301: 1099–1102.
- Geis, G., Suerbaum, S., Forsthoff, B., Leying, H., Opferkuch, W. (1993). Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. *Journal of Medical Microbiology* 38; 5: 371-377.
- Gobert, A.P., McGee, D.J., Akhtar, M. (2001). *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A* 9: 13844-13849.
- Godwin, C.S., W-McConnel, R.K., McCulloch, C., McCullough, R., Hill, M.A., Bronsdon., Kasper, G. (1989). Cellular fatty acid composition *Campylobacter pylori* from primates and ferrets compared with those of other campylobacters. *Journal of Clinical Microbiology* 27: 938-943.
- Godwin, C.S., Armstrong, J.A., Chilvers, T., Peters, M., Collins, L., Sly, L., McConnel, W., Harper, W.S. (1990). Transfers of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelaeto Helicobacter* gen. nov as *Helycobacter pylori* comb. nov and *Campylobacter mustelae* comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic Bacteriology* 4: 397-405.
- Goodman, K.J., Correa, P. (2000). Transmission of *Helicobacter pylori* among siblings. *The Lancet* 355: 358-362.
- Graham, D.Y., Lew, G.M., Klei, P.D., Evans, D.G., Evans, D.J., Saeed, Z.A., Malaty, H.M. (1992). Effect of treatment of *Helicobacter pylori* infection on the long-term recurrence of gastric or duodenal ulcer, a randomized, controlled study. *Annals of Internal Medicine* 116: 705-708.
- Graham, D. (2002). *Protecting Traditional Knowledge and Folklore: UNCTAD/ICTSD Capacity Building Project on Intellectual Property Rights and Sustainable Development.*
- Graham, D.Y., Fischbach, L. (2010). *Helicobacter pylori* treatment in the era of increasing antibiotic resistance. *Gut* 59: 1143-1153.
- Guslandi, M., 1994. Antiulcer drugs and gastric mucosal blood flow. *Pharmacological Research*, 30: 93-98.

- Gur, G., Boyacioglu, S., Gul, C., Turan, M., Cursoy, M., Baysal, C., Ozdermir, N. (1999). Impact of *Helicobacter pylori* infection on serum gastrin in haemodialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation* 14: 2688-2691.

H

- Ham, M., Kauntz, J. D. (2007). Gastroduodenal defense. *Current Opinion in Gastroenterology* 23: 607–616.
- Harborne, J.B. (1988). *The Flavonoid Advances in Research since 1980*. Chapman and Hall.
- Harborne, J.B. (1984). Phytochemical methods. In a guide to modern techniques of plants analysis. 2a. Ed. Chapman and Hall.
- Harvey, A. (2008). Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today* 13: 894–901.
- Hasen, P., Go, M., Varming, K., Andersen, L., Genta, R., Graham, D., Nielsen, H. (1999). Proinflammatory activation of neutrophils and monocytes by *Helicobacter pylori* in patients with different clinical presentations. *Infection and Immunity* 31: 3171-3174.
- Hatazawa, R., Tanaka, A., Tanigami, M., Amagase, K., Kato, S., Ashida, Y., Takeuchi, K. (2007). Cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 accelerates the healing of gastric ulcers via EP4 receptors. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 293: G788–G797.
- Hayllar, J., Bjarnason, I. (1995). NSAIDs, Cox-2 inhibitors, and the gut. *The Lancet* 346: 521-522.
- Hazell, S., Evans-Jr, D., Graham, D. (1991). *Helicobacter pylori* catalase. *Journal of General Microbiology* 137: 57-61.
- Henman, F. D., (1970). Inhibition of peptic activity by carbenoxolone and glycyrrhetic acid. *Gut* 11: 344-351.
- Herbarth, O.P., Krumbiegel, G.J., Fritz, M., Richter, U., Schlink, D.M., Muller-Richter, T. (2001). *Helicobacter pylori* prevalences and risk factors among school beginners in a German urban center and its rural county. *Environmental Health Perspectives* 109: 573-577.
- Hernández, F. (1959). *Historia Natural de Nueva España*. Volúmenes 1 y 2. Obras Completas, Tomos II y III. México D.F: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hersch-Martinez, P. (1995). Commercialization of medicinal plants from southwest Puebla, Mexico. *Economic Botany* 49: 197-206.
- Hulten, K., Enroth, H., Nystrom, T., Engstrand, L. (1998). Presence of *Helicobacter* species DNA in Swedish water. *Journal of Applied Microbiology* 85: 282-286.

I

- INEGI/Secretaría de Salud. DGIS, (2008). Elaborado a partir de la base de datos de defunciones 2008 y CONAPO 2006.
- Innocenti, M.A., Svennerholm, M., Drumm, B. (2001). Is *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides preferentially induce CXC chemokine production in human monocytes. *Infection and Immunity* 69: 3800-3808.
- Iwata, F., Koo, A., Itoh, M., Lsm, K., Leung, J.W.C., Leung, F.W. (1997). Functional evidence linking potassium channels and afferent nerve-mediated mucosal protection in rat stomach. *Life Sciences* 61: 1713-1720.

J

- Janas, B., Czkwianianc, E., Bak-Romaniszyn, L., Bartel, H., Tosik, D., Planeta-Malecka, I. (1995). Electron microscopic study of association between coccoid forms of *Helicobacter pylori* and gastric epithelial cells. *American Journal of Gastroenterology* 90: 1829-1833.
- Ji, H.F., Li, X. J., Zhang, H.Y. (2009). Natural products and drug discovery. Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia? *EMBO Reports* 10: 194–200.
- Jiangyong, G., Yuanshen, G., Lirong, C., Gu, Y., Hui-Zhe, L., Xiaojie, X. (2013). Use of Natural Products as Chemical Library for Drug Discovery and Network Pharmacology. *PLoS*. 8; 4: 1-10.

K

- Kawase, M., Motohashi, N. (2004). Plant-derived leading compounds for eradication of *Helicobacter pylori*. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Infective Agents* 3: 89- 100.

- Kingston, D.G.I. (2011). Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. *Journal of Natural Products* 74: 496– 511.
- Kitamura, M., Sugamoto, S., Kawauchi, S., Kato, S., Takeuchi, K. (1999). Modulation by endogenous nitric oxide of acid secretion induced by gastric distention in rats: enhancement by nitric oxide synthase inhibitor. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 291: 181-187.
- Konturek, S. J., Brzozowski, T., Majka, J., Pytko-Polonczyk, J., Stachura, J. (1993). Inhibition of nitric oxide synthase delays healing of chronic gastric ulcers. *European Journal of Pharmacology* 239: 215-217.
- Konturek, S.J., Konturek, P.C., Brzozowski, T. (2005). Prostaglandins and ulcer healing. *Journal of Physiology and Pharmacology* 56: 5-31.
- Kuipers, E.J., Thijs, J.C., Festen, H.P. (1995). The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 9; Supplement 2: 59-69.
- Kuipers, E.J. (1999). Review article: exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 13: 3-12.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N. (2005). Robbins and Contran Pathologic basis of disease. Seventh Edition. Elsevier Saunders: 810-827.
- Kusters, J.G., van-Vliet, A.H., Kuipers, E.J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology Reviews* 19: 449–490.

L

- Lengsfeld, C., Deters, A., Faller, G., Hensel, A. (2004). High molecular Weight polysaccharides from black currant seeds inhibit adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa. *Planta Medica* 70: 620-626.
- Lambert, J.R., Lin, S.K., Aranda-Michel, J. (1995). *Helicobacter pylori*. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*; Supplement 208: 33-46.
- Lee J.H., Shim J.S., Lee, J.S., Kim, M.K., Chung, M.S., Kim, K.H. (2006). Pectin-like acid polysaccharide from *panax ginseng* with selective antiadhesive activity against pathogenic bacteria. *Carbohydrate Research* 341: 1154-1163.
- Lee K.M., Yeo, M., Choue, J.S., Jin, J.H., Park, S.J. Cheong, J.Y., Lee, K.J., Kim, J.H., Hahm, K.B. (2004). Protective mechanism of epigallocatechin-3-gallate against *Helicobacter pylori* induced gastric epithelial cytotoxicity via the blockage of TLR-4 signaling. *Helicobacter* 9: 632-642.
- Lee. A.M., Dixon, F., Danon, S.J., Kuipers, E., Megraud, F., Larson, H., Mellgard, B. (1995). Local acid production and *Helicobacter pylori*: a unifying hipótesis of gastroduodenal disease. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 7: 461-465.
- Ley General de Salud. (2010). Artículo 224, Fracción B-III. Diario oficial de la federación 27-04-2010.
- Li, C., Ha, T., Ferguson, D.A., Chi-Jr, D.S., Zhao, R., Patel, NR., Krishnaswamy, G., Thomas, E. (1996). A newly developed PCR assay of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy, saliva, and feces. Evidence of high prevalence of *Helicobacter pylori* in saliva supports oral transmission. *Digestive Diseases and Sciences* 41(11): 2142-2149.
- Li, Y., Xu, C., Zhang, Q., Liu, J.Y., Tan R.X. (2005). In vitro anti-*Helicobacter pylori* action of 30 Chinese herbal medicines used to treat ulcer diseases. *Journal of Ethnopharmacology* 98: 329- 333.
- Linz, B., Balloux, F., Moodley, Y., Manica, A., Liu, H., Roumagnac-Falush, D., Stamer, C., Prugnolles, F., Schalk, W. van-der-Merwe., Yamaoka, D., Pérez-Talleros, E., Wadstrom, T., Suerbaum, S., Achtman. (2007). An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* 445: 915-918.
- Logan, R.P.H., Walker, M.M. (2001). ABC of the upper gastrointestinal tract. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *British Medical Journal* 323:920-922.
- Loguercio, C., Taranto, D., Beneduce, F., del-Vecchio-Blanco, C., de-Vincentiis, A., Nardi, G., Romano, M. (1993). Glutathione prevents ethanol induced gastric mucosal damage and depletion of sulfhydryl compounds in humans. *Gut* 34: 161-165.
- López-Carrillo, L., López-Cervantes, M., Robles-Díaz, G., Ramírez-Espítia, A., Mohar- Betancourt, A., Meneses-García, A., López-Vidal, Y., Aaron-Bleir, A. (2003). Capsaicin consumption, *Helicobacter pylori* positivity and gastric cancer in México. *International Journal of Cancer* 106: 277- 282.

- López-Carrillo, L., Fernández-Ortega, M.C., Costa-Dias, R., Franco-Marina, J., Alejandro-Badillo, T. (1995). Beliefs about chili pepper consumption and health in Mexico City. *Salud Pública de México* 37: 339-343.
- Lorke, D. (1983). A New Approach to Practical Acute Toxicity Testing. *Archives of Toxicology* 54: 275-287.
- Loughlin, M.F., Barnard, F.M., Jenkins, D., Sharples, G.J., Jenks, P. J. (2003) *Helicobacter pylori* mutants defective in RuvC Holliday junction resolvase display reduced macrophage survival and spontaneous clearance from the murine gastric mucosa. *Infection and Immunity* 71: 2022–2031
- Luo, J.C., Shin, V.Y., Liu, E.S., Ye, Y.N., Wu, W.K., So, W.H., Chang, F.Y. (2004). Dexamethasone delays ulcer healing by inhibition of angiogenesis in rat stomachs. *European Journal of Pharmacology*. 485: 275–81.
- Luo, J.C., Lin, H.Y., Lu, C.L., Wang, L.Y., Chang, F.Y., Lin, H.C., Huang, Y.C. (2008). Dexamethasone inhibits basic fibroblast growth factor-stimulated gastric epithelial cell proliferation. *Biochemical Pharmacology* 76: 841-9.

M

- Makola, D., Peura, D.A., Crowe, S.E. (2007). *Helicobacter pylori* Infection and Related Gastrointestinal Diseases. *Journal of Clinical Gastroenterology* 41: 548-558.
- Malaty, H.M., Graham, D.Y. (1994). Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 35:742-745.
- Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C.A., Atherton, J., Axon, A.T.R., Bazzoli, F., Gensini, G.F., Gisbert, J.P., Graham, D.Y., Rokkas, T., El-Omar, E.M., Kuipers, E.J. The European Helicobacter Study Group (EHSg). (2012). Management of *Helicobacter pylori* infection. The Maastricht IV/ Florence Consensus Report. Editor's Choice. *Gut* 61: 646-664.
- Marieb, E.N., Hoehn, K. (2010). Human anatomy & physiology. Eighth edition. Benjamin Cummings: 866-877.
- Martínez, Maximino. (1969, 1990). Plantas Medicinales de México. México D.F: Ed. Botas. 657p.
- Masuda, E., Kawano, S., Nagano, K., Tsuji, S., Takei, Y., Tsujii, M., Oshita, M., Michida, T., Kobayashi, I., Nakama, A., Fusamoto, H. y Kamada, T. (1995). Endogenous nitric oxide modulates ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *Gastroenterology* 108: 58-64.
- Matsuda, H., Li, Y., Yoshikawa, M. (1999). Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulfhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by momordinic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol induced gastric mucosal lesions in rats. *Life Sciences* 65: 27-32.
- Miller, T.A. (1983). Protective effects of prostaglandins against gastric mucosal damage: current knowledge and proposed mechanisms. *The American Physiological Society* 245: G601-G623.
- Mitchell, H. (2001). Epidemiology of Infection. In: *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics. (Eds. Mobley, H.L.T., Mendz, G.L. y Hazell, S.L.) ASM Press Washington: 7-18.
- Miyazawa, M., Utsunomiya, H., Inada, K., Yamada, T., Okuno, Y., Tanaka, H., Tatemats, M. (2006). Inhibition of *Helicobacter pylori* motility by (+)-Syringaresinol from unripe Japanese apricot. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 29: 172- 173.
- Mobley, H.L.T. (2001). Ureasa. En: *Helicobacter pylori*: Physiology and genetics. (Eds. Mobley, H.L.T., Mendz, G.L. y Hazell, S.L.). ASM Press. USA: 179- 191.
- Molhar, A.C., Guarner, J., Goepfert, R., Sanchez, L., Halperin, D., Personnet, J. (2002). Alta frecuencia de lesiones de cáncer gástrico asociadas a *Helicobacter pylori* y respuesta al tratamiento en Chiapas México. *Gaceta Médica México* 138; 5: 405-410.
- Molinari, M., Salio, M., Galli, C. (1998). Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *The Journal of Experimental Medicine* 187: 135-140.
- Morales, M.R. (2000). Diversidad genética de vacA en cepas de *Helicobacter pylori* y su asociación con la vacuolización en las células HeLa. Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina UNAM: 85 pp.
- Moore, K.L., Dalley, A.F., Agur, A.M.R. (2010). Anatomía con orientación clínica. 6ª Edición. Lippincott Williams & Wilkins: 230-239.
- Murakami, M., Ota, H., Sugiyama, A., Ishizone, S., Maruta, F., Akita, N., Okimura, Y., Kumagai, T., Jo, M., Tokuyama, T. (2005). Suppressive effect of rice extract on *Helicobacter pylori* infection in a Mongolian gerbil model. *Journal of Gastroenterology* 40: 459- 466.

- Mutoh, H., Hirashi, H., Ota, S., Ivey, K.J., Terano, A., Sugimoto, T. (1990). Role of oxygen radicals in ethanol-induced damage to cultured gastric mucosal cells. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 258: G603-G609.

N

- Navarrete, A., Mata, R., Delgado, G. (1989). Alkylanacardic acids from *Amphipterygium adstringens*, *Planta Medica* 55: 579.
- Navarrete, A., Sánchez, R., Galicia, R., Reyes, B., Estrada, E. (1992). Plantas medicinales empleadas en el tratamiento de úlcera péptica en México. *Etnobotánica* 92: 20-26.
- Navarrete, A., Mata, R., Delgado G. (1998). Alkyl anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*, *planta Medica* 55: 579.
- Navarrete, A., Martínez-Uribe, L.S., Reyes, B. (1998). Gastroprotective activity of the stem bark of *Amphipterygium adstringens* in rats. *Phytotherapy research* 12: 1-4.
- Navarrete, A., Trejo-Miranda, J.L., Reyes-Trejo, L. (2002). Principles of root bark of *Hippocratea excelsa* (Hippocrataceae) with gastroprotective activity. *Journal of Ethnopharmacology* 79: 383-388
- Nakagawa, H., Takaishi, Y., Tanaka, N., Tsuchiya, K., Shibata, H., Higuti, T. (2006). Chemical constituents from the peels of *Citrus sudachi*. *Journal of Natural Products* 69: 1177-1179.
- Nathan, C., Shiloh, M.U. (2000) Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 97: 8841-8848
- Newman, D.J., Cragg, G.M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products* 75: 311-335.
- 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.
- Nugroho, L.H., Verpoorte, R. (2002). Secondary metabolism in tobacco. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68 105–125.

O

- Ogura, K., Maeda, S., Nakao, M., Watanab, T., Tada M., Kyutoku T., Yoshida H., Shiratori Y., Omata M. (2000). Virulencia factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in Mongolian Gerbil. *The Journal of Experimental Medicine* 192: 1601-1609.
- Okabe, S., Amagase, K. (2005). An overview of acetic acid ulcer models. The history and state of the art of peptic ulcer research. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 28: 1321—1341.
- O'Mahony, R., Al-Khtheeri, H., Weerasekera, D., Fernando, N., Vaira, D., Holton, J., Basset, C. (2005). Bactericidal and antiadhesive properties of culinary and medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastroenterology* 11: 7499- 7507.
- Organización Mundial de la Salud. (2002). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional: 2002-2005. Ginebra (documento WHO/EDM/TRM/2002.1).
- O'Rourke, J., Bode, G. (2001). Morphology and Ultrastructure. En: *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics. (Eds. Mobley, H.L.T., Mendz, G.L. y Hazell, S.L.).
- Osbourn, A.E. (1996) .Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *The Plant Cell* 8: 1821-1831.
- Otsuka, T., Tsukamoto, T., Tanaka, H., Inada, K., Utsunomiya, H., Mizoshita, T., Kumagai, T., Katsuyama, T., Miki, K., Tatematsu, M. (2005). Suppressive effects of fruit-juice concentrate of *Prunus mume* Sieb. Et Zucc. (Japanese apricot, Ume) on *Helicobacter pylori*-induced glandular stomach lesions in Mongolian gerbils. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 6: 337-341.

P

- Park, S., Yeo, M., Jin, J., Lee, K.M., Jung, J., Choue, R., Cho, S., Hahm, K. (2005). Rescue of *Helicobacter pylori*-induced cytotoxicity by red ginseng. *Digestive Diseases and Sciences* 50: 1218-1227.
- Parmar, N.S., Tariq, M., Alyhya, M.A., Ageel, A.M., Alsaid, M.S. (1986). Evaluation of *Aloe vera* leaf exudate and gel for gastric and duodenal antiulcer activity. *Fitoterapia*. 57: 5.

- Pateh, U.U., Haruna, A.K., Garba, M., Iliya, I., Sule, I.M., Abubakar, M.S., Ambi, A.A. (2009). Isolation of stigmaterol, β -sitosterol and 2-hydroxyhexadecanoic acid methyl ester from the rhizomes of *Stylochiton lancifolius* Pyer and Kotchy (Araceae). Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences 8; 1: 19-25.
- Patwardhan, B., Warude, D., Pushpangadan, P., Bhatt, N. (2005). Ayurveda and traditional Chinese medicine: a comparative overview. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2: 465-473.
- Payá, M., Ferrándiz, M.L., Sanz, M.J., Bustos, G., Blasco, R., Ríos, J.L. (1993). Study of the antiedema activity of some seaweed and sponge extracts from the mediterranean coast in mice. Phytotherapy Research 7: 159-162.
- Pearce A.G.E. (1978). Histochemistry theoretical and applied. Vol. I and II. Third edition. J. and A. Churchill. Ltd, London.
- Pellever, J. (1993). Principios activos y preparaciones farmacéuticas de las plantas medicinales. Natura medicatrix 32: 21-24.
- Perez-Perez, G.I., Shepherd, V.L., Morrow, J.D., Blaser, M.J. (1995). Activation of human THP-1 cells and rat bone marrow-derived macrophages by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. Infection and Immunity 63: 1183-1187.
- Perez-Perez, G.I., Rothenbacher D., Brenner, H. (2004). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 9; Supplement 1: 1-6.
- Peskar, B.M., Lange, K., Hoppe, U., Peskar, B.A. (1986). Ethanol stimulates formation of leukotriene c4 in rat gastric mucosa. Prostaglandins 31: 283-93.
- Peskar, B.M., Ehrlich, K., Peskar, B.A., (2002). Role of ATP-sensitive potassium channels in prostaglandin-mediated gastroprotection in the rat. The journal of pharmacology and experimental therapeutics 301: 969-974.
- Portal-Celhay, C., Perez-Perez, G.I. (2006). Immune responses to *Helicobacter pylori* colonization: mechanisms and clinical outcomes. Clinical Science 110: 305-314.
- Pounder, R.E., Ng, D. (1995). The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. Alimentary Pharmacology & Therapeutics 9: 33-39.

R

- Ramarao, N., Gray-Owen, S.D., Backert, S., Meyer, T.F. (2000) *Helicobacter pylori* inhibits phagocytosis by professional phagocytes involving type IV secretion components. Molecular Microbiology 37: 1389-1404.
- Ramarao, N., Meyer, T.F. (2001) *Helicobacter pylori* resists phagocytosis by macrophages: quantitative assessment by confocal microscopy and fluorescence activated cell sorting. Infection and Immunity 6: 2604-2611.
- Rao, S.R., Ravishankar, G.A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances 20: 101-153.
- Rietschel, E.T., Brade, O., Brandenburg, K. (1987) Chemical structure and biologic activity of bacterial and synthetic lipid A. Reviews of Infectious Diseases 9: 527-536.
- Robert, A., Nezamis, J., Lancaster, C., Hanchar, A.J., Robert, A., Nezamis, J.E. (1979). Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCL, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. Gastroenterology 77: 433-443.
- Robinson, K., Louglin, M.F., Potter, R., Jenks, P.J. (2005) Host adaptation and immune modulation are mediated by homologous recombination in *Helicobacter pylori*. The Journal of Infectious Diseases 191: 579-587
- Rodriguez-López, V., Salazar, L., Estrada, S. (2003). Spasmolytic activity of several extracts obtained from some Mexican medicinal plants. Fitoterapia 74: 725-728.
- Rodríguez-Lopez, V., Aguirre-Crespo, F., Salazar, L., Estrada-Soto, S. (2006). Identification of fatty acid esters and hydrocarbon derivatives from *Cyrtocarpa procera* by GC-MS. Natural Products Research 20: 1-7.
- Rosas-Acevedo, H., Terrazas, T., Gonzalez-Trujano, M.E., Guzman, Y., Soto-Hernandez, M., (2011). Anti-ulcer activity of *Cyrtocarpa procera* analogous to that of *Amphipterygium adstringens*, both assayed on the experimental gastric injury in rats. Journal of Ethnopharmacology 134: 67-73.

- Ruberté, R.M., Martin, F.W. (1975). Edible leaves of the tropics agricultural research service. Washington D.C. 245 p.

S

- Salim, A.S. (1994). Role of free radical scavengers in the management of refractory duodenal ulceration. A new approach. *Journal of Surgical Research* 56: 45-52.
- Schmassmann, A., Tarnawski, A., Peskar, B.M., Varga, L., Flogerzi, B., Halter, F. (1995). Influence of acid and angiogenesis on kinetics of gastric ulcer healing in rats: interaction with indomethacin. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 268: G276-G285.
- Schultes, R.E., Raffauf, R.F. (1990). *The Healing Forest*, Dioscorides Press, Portland.
- Shmueli, H., Burger, O., Neeman, I., Yahav, J., Samra, Z., Niv, Y., Sharon, N., Weiss, E., Athamna, A., Tabak, M., Ofek, I. (2004). Susceptibility of *Helicobacter pylori* isolates to the antiadhesion activity of a high-molecular-weight constituent of cranberry. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 50: 231-235.
- Sobrino-Cosío, S., Rivera-Ramos, J. F., Ayala-Aguilar, G. (2007). Tercer Consenso Mexicano sobre *Helicobacter pylori*. Mesa 1. Epidemiología y fisiopatogenia. *Revista de Gastroenterología de México* 72; 3: 138-142.
- Spilgelhalder, C., Gerstenecker, B., Kersten, A., Schiltz, E., Kist, M. (1993). Purification of *Helicobacter pylori* superoxide dismutase and cloning and sequencing of the gene. *Infection and Immunity* 61:5315-5325
- Standley, P.C. (1920-1926). Trees and Shurbs of Mexico. Contributions from the United States National Herbarium 23: 1-1721.
- Stewart, D.J., Ackroyd, R. (2011). Peptic ulcers and their complications. *Oesophagus and stomach. Surgery* 29:11.
- Sibony, M., Jones, N.L. (2012). Recent advances in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Current Opinion in Gastroenterology*: 28; 1: 30-35.

T

- Takagi, A., Koga, Y., Aiba, Y., Kabir, A.M., Watanabe, S., Ohta-Tada, U., Osaki, T., Kamiya, S., Miwa, T. (2000). Plaunotol suppresses interleukin-8 secretion induced by *Helicobacter pylori*: therapeutic effect of plaunotol on *H. pylori* infection. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 15: 374-380.
- Takeuchi, K., Yagi, K., Kitamura, M., Kubomi, M. (1998). Stimulation of duodenal bicarbonate secretion by carbenoxolone in rats: a comparative study with prostaglandin E₂. *General Pharmacology*, 30: 739-744.
- Tan, S., Tompkins, L.S., Amieva, M.R. (2009). *Helicobacter pylori* usurps cell polarity to turn the cell surface into a replicative niche. *PLoS pathogens* 5; 5: 1-13.
- Tarnawski, A.S. (2005). Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. *Digestive, Diseases and Sciences* 50: S24-S33.
- Tominaga, K., Higuchi, K., Hamasaki, N., Hamaguchi, M., Takashima, T., Tanigawa, T., Watanabe, T., Fujiwara, Y., Tezuka, Y., Nahaoka, T., Kadota, S., Ishii, E., Kobayashi, K., Arakawa, T. (2002). *In vivo* action of novel alkyl methyl quinolone alkaloids against *Helicobacter pylori*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50: 547- 552.
- Torres, J., Leal-Herrera, Y., Pérez-Pérez, G., Gómez, A., Camorlinga-Ponce, M., Cedillo-Rivera, R., Tapia-Conyer, R., Muñoz, O. (1998). A Community-Based Seroepidemiologic Study of *Helicobacter pylori* Infection in Mexico. *The Journal of Infectious Diseases* 178:1089-1094.
- Torres, J., López, L., Muñoz, O. (2005). Trends in *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in México. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention* 14: 1874-1877.
- Tummala, S., Keates, S., Kelly, C.P. (2004). Update on the immunologic basis of *Helicobacter pylori* gastritis. *Current Opinion in Gastroenterology* 20: 592-597.

V

- Vakil, N. (2006). *Helicobacter pylori* treatment: a practical approach, *The American Journal of Gastroenterology* 101; 3: 497-499.

- Vakil, N., Megraud, F. (2007). Eradication therapy for *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 133: 985-1001.
- Vakil, N. (2009). *H. pylori* Treatment: New Wine in Old Bottles?. *The American Journal of Gastroenterology* 104: 26-30.
- Valdés, J., Flores, H. (1985). Historia de las Plantas de Nueva España, en Comentarios a la Obra de Francisco Hernández. Obras Completas, Tomo VII. México, D.F: Universidad Nacional Autónoma de México: 7-222.
- Van-de-Loo, F.J., Fox, B.G., Somerville, C. (1993) in Lipid Metabolism in Plants, ed. Moore, T.S., Jr. (CRC, Boca Ratón, FL): 91-126.

W

- Waldman, S.A. y Terzic, A. (2010). Farmacología y terapéutica. Principios para la práctica. Primera edición. Manual moderno: 457-472.
- Wallace, J.L., Granger, D.N. (1996). The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. *The FASEB Journal*, 10: 731-740.
- Warren, J.R. (1983). Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *The Lancet*; 1: 1273-1275.
- Whittle, B.J.R., Lopez-Belmonte, J., Moncada, S. (1990). Regulation of gastric mucosal integrity by endogenous nitric oxide: interactions with prostanoids and sensory neuropeptides in the rat: *British Journal of Pharmacology* 99: 607-611
- Wolle, K., Malfertheiner, P. (2007). Treatment of *Helicobacter pylori*. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 21: 315-324

Y

- Yee, Y.K., Koo, M.W., Szeto, M.L. (2002). Chinese tea consumption and lower risk of *Helicobacter* infection. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 17: 552-555.
- Yoshiyama, H., Nakazawa, T. (2000). Unique mechanism of *Helicobacter pylori* for colonizing the gastric mucus. *Microbes and infeccion* 2: 55-60.

Z

- Zhang, H.M., Wakisaka, N., Maeda, O., Yamamoto, T. (1997). Vitamin C inhibits risk factor the growth of a bacterial risk factor for gastric carcinoma: *Helicobacter pylori*. *Cancer* 80: 1897-903.

13.- PUBLICACIONES

Escobedo-Hinojosa., W. I., Díaz del Carpio, J., Palacios-Espinosa, J. F., Romero, I. (2012) Contribution to the ethnopharmacological and anti-*Helicobacter pylori* knowledge of *Cyrtocarpa procera* Kunth (Anacardiaceae). Journal of Ethnopharmacology 143; 1: 363–371.

Palacios-Espinosa, F., **Escobedo-Hinojosa W.,** Romero I. 2011. Panorama actual del estudio de las plantas con actividad anti-*Helicobacter pylori*. TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas, 14; 1: 51-61.

Escobedo-Hinojosa., W. I., García., M. K., Guerrero., A. R., Romero, I. Mechanism involved in the gastroprotective activity and gastric ulcer healing effect of methanolic extract from *Cyrtocarpa procera*. (En preparación para ser enviado a la revista Journal of Ethnopharmacology).

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://SciVerse.ScienceDirect.com)

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jep

Contribution to the ethnopharmacological and anti-*Helicobacter pylori* knowledge of *Cyrtocarpa procera* Kunth (Anacardiaceae)

Wendy Itzel Escobedo-Hinojosa, Joel Díaz del Carpio, Juan Francisco Palacios-Espinosa, Irma Romero*

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 April 2012

Received in revised form

28 June 2012

Accepted 3 July 2012

Available online 13 July 2012

Keywords:

Gastric ulcer

Antimicrobial

Inflammation

Toxicity

*Helicobacter pylori**Cyrtocarpa procera*

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Cyrtocarpa procera* Kunth (Anacardiaceae) is a Mexican endemic tree; its bark has been traditionally employed in Mexico since prehispanic times to relieve digestive disorders.

Aim of the study: To perform an acute evaluation of the toxicity, gastroprotective, and anti-inflammatory properties, as well as the anti-*Helicobacter pylori* action of *C. procera* bark extracts, in order to determine polypharmacological activities.

Materials and methods: Five different polarity extracts (hexanic, CH₂Cl₂, CH₂Cl₂-MeOH, methanolic, and aqueous) were prepared. Each of them was evaluated in the following acute mice models: toxicity Lorke test, ethanol-induced gastric ulcer, TPA-induced ear edema; and the *in vitro* anti-*H. pylori* activity with a broth dilution method.

Results: None of the extracts were toxic under acute administration. The methanolic, hexanic, and aqueous extracts possess remarkable gastroprotective activity. All the extracts inhibit *H. pylori* growth, being the hexanic the most active, and only this one showed significant anti-inflammatory effect.

Conclusions: This work demonstrates that *C. procera* bark has polypharmacological activities; which makes it a promising asset to the development of an integral treatment for gastritis or peptic ulcer related or not to *H. pylori*. Our findings contribute to the ethnopharmacological knowledge about this species.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cyrtocarpa procera Kunth (Anacardiaceae) commonly known as “chupandilla”, “copalcojote” or “coco de cerro” is endemic to Mexico and is mainly distributed in the states of Jalisco, Michoacan, Nayarit, Guerrero, Oaxaca, Mexico, Morelos, and Puebla. The aqueous decoction and infusion of *C. procera* bark are widely used in Mexican folk medicine for digestive disorders such as dysentery and diarrhea, for kidney ailments, and for toothaches. Other references just mention to be prepared as a “Tea” (which people prepare both, as an infusion or a decoction) for the treatment of some of the mentioned illnesses. It is also used as cataplasms for skin cuts; and as antiseptic (Argueta et al., 1994; Canales et al., 2005; 2006). Previous phytochemical studies on *C. procera* bark resulted in the isolation and identification of some sterols as β -amyrin and β -sitosterol, and the fatty acids 1,3-propyl-dipentadecanoate, 3-hydroxypropyl-9-octadecenoate, pentadecylbenzene, eicosylbenzene, docosane, heptacosane, dotriacontane and 2,6,10-trimethyltetradecane (Rodríguez-López et al., 2006; Rosas-Acevedo et al., 2011). Pharmacological studies reported the antiulcerogenic activity of *C. procera* bark extracts in an ethanol induced

gastric ulcer model in rats (Rosas-Acevedo et al., 2011), and no spasmolytic activity has been detected against the spontaneous contraction of rat ileum by a CHCl₃-MeOH [1:1] extract (Rodríguez-López et al., 2003). Regarding the antibiotic activity, Canales et al. (2005) reported some antibacterial activity of a methanolic extract against a range of Gram-positive (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*) and Gram-negative bacteria (*Vibrio cholerae* and *Shigella boydii*). Nevertheless, Rodríguez-López et al. (2006) were unable to find any activity against *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus subtilis*. On the other hand, our group has reported anti-*Helicobacter pylori* activity of aqueous and methanolic extracts of *C. procera* (Castillo-Juárez et al., 2009).

H. pylori colonizes more than half of the world's population, with high colonization rates in developing countries where the infection is usually acquired during childhood. It is the main cause of peptic ulcer, gastric adenocarcinoma, and gastric lymphoma. *H. pylori* virulence factors damage gastric epithelial cells directly or by a marked immune response with local neutrophil, lymphocyte and other inflammatory cell infiltration, antibody production and cell-mediated responses. This bacterial mediated process is gastritis, and is central to the pathogenesis of all *H. pylori* associated diseases; the development of any of them will depend on the type and distribution of inflammation in the stomach, which in turn depends on host genetics, bacterial strain,

* Corresponding author. Tel.: +5255 56232511; fax: +5255 56162419.
E-mail address: irma@bq.unam.mx (I. Romero).

and environmental factors. Fifteen percent of infections result in peptic ulcerations and only 0.5 to 2% in gastric adenocarcinoma (Atherton, 2006).

First-line therapy for treating *H. pylori* infection consists of a proton pump inhibitor with any combination of two antibiotics: amoxicillin, clarithromycin or metronidazole, given for 7–14 day. However, because approximately 20% of patients fail to obtain eradication, a second-line therapy, a quadruple regimen, is recommended in these cases, composed of tetracycline, metronidazole (or others depending on the initial treatment), bismuth salts and a proton pump inhibitor. Currently, antibiotic resistance is the greatest obstacle to the successful treatment of *H. pylori* infection. Also, the emergence of adverse side effects caused by antibacterial drugs may result in the need to stop eradication therapy even if the objective has not been achieved. Therefore, there is an intense demand for novel therapeutic regimens having the same or higher beneficial properties of antibiotics, but with reduced side effects and at an accessible cost.

Over the last decades, there has been an increased use of alternative medicines in many developed and developing countries; traditional herbal medicines are the most popular. Moreover, according to WHO (2005), a large number of the world's population relies on traditional medicine and medicinal plants for its primary health needs. Since their use is related to empiricism in many cases, and there is a big lack of scientific studies to support their use, safety and efficacy have become important concerns for authorities and general public.

Plant natural products have been sources for the discovery and development of antiulcer and anti-inflammatory agents, and more recently used for the search of new anti-*H. pylori* compounds.

The aim of this study is to make a systematic evaluation of the anti-*H. pylori*, anti-inflammatory and gastroprotective properties of different polarity *C. procera* extracts in order to identify if any of them has polypharmacological effects, as well as to identify the toxicity of the species. This approach would establish a precedent in the search for an integral therapy for the treatment of *H. pylori* related diseases.

2. Materials and methods

2.1. Drugs and chemicals

For acute toxicity and acute gastric ulcer assays, hexane (HX) and CH_2Cl_2 (DM) extracts were prepared in 10% Tween 80 in 0.9% NaCl (saline), homogeneous suspensions of these extracts were obtained; while CH_2Cl_2 -MeOH (DM-MET), methanolic (MET) and aqueous (AQ) were suspended in saline. Carbenoxolone was used as a reference drug in the acute gastric ulcer model and was dissolved in saline. All the samples to be administered by intragastric route, independently of the final concentration to be used, were always dissolved in a volume of 15 mL/kg.

Since the volume to be administered depends on the mouse weight, for the acute toxicity assay the volume administered was between 300 μL and 375 μL ; and for acute gastric ulcer model was between 525 μL and 600 μL , with no detectable effects on the assays.

For anti-inflammatory assays 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), Indomethacin, HX and DM were dissolved in 100% acetone while Dexamethasone, DM-MET, MET and AQ were dissolved in 50% acetone in distilled water. The solvents were chosen according to their volatility and sample solubility and did not have significant effect on the assay. Carbenoxolone, Indomethacin and TPA, were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), Dexamethasone was obtained from CHINOIN[®].

2.2. Plant material

The stem bark from *C. procera* was collected on March 2010 in the municipality of Jojutla, Morelos in the Higuieron Locality. Vouchers specimen 125630 and 125636 were deposited in the Faculty of Sciences Herbarium located at the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

2.3. Extracts preparation

The aqueous extract (AQ) was prepared by infusion of 120 g of dried and ground stem bark with 3 L of boiled water for 30 min. After filtration, the extract was lyophilized. The organic extracts were prepared by exhaustive maceration of 100 g of dried and ground vegetable material, using 1 L of different solvents as hexane, CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 -MeOH [1:1] and MeOH (this procedure was repeated 5 times). Solvents were evaporated on reduced pressure to obtain hexanic (HX), CH_2Cl_2 (DM), CH_2Cl_2 -MeOH (DM-MET), and methanolic (MET) extracts.

2.4. Animals

CD-1 male mice weighing 20–25 g or 35–40 g from UNAM's Facultad de Medicina vivarium were used. They were housed under standard laboratory conditions and maintained on a standard pellet diet and water *ad libitum*. Procedures involving animals and their care were approved by the local animal ethics committee and conducted in conformity with the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999) and in compliance with international regulations on care and use of laboratory animals. Efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used (NIH Guidelines).

2.5. In vivo acute toxicity of *C. procera* extracts

The acute toxicity of AQ, MET, DM-MET, DM and HX extracts was estimated by oral administration as described by Lorke (1983). The method estimates the dose of a certain compound or extract that kills 50% of the animal population (LD_{50}) by a given administration route. Mice were divided into different groups ($n=3$) and treated with doses of 10, 100, 1000, 1600, 2900 and 5000 mg/kg of the corresponding extract or saline alone for the control group (for sample preparation see Section 2.1.). The animals were kept under close observation over a period of 14 day. Restlessness, respiratory distress, convulsions, diarrhea, motor activity, posture and reflexes were qualitatively determined. The weight of the animals was monitored throughout the experiments.

2.6. Acute gastric ulcers induced by absolute ethanol

Ulceration was induced according to the method described by Bucciarelli and Skliar (2007) by intragastric instillation of absolute ethanol. Mice were divided into different groups ($n=4$). Subsequently, animals were placed in single cages with wire-net floors to avoid coprophagy and deprived of food for 24 h before the assay. Each group received by gastric gavage either the vehicle, the corresponding extract (0.1–300 mg/kg), or carbenoxolone (50 mg/kg) in a volume of 15 mL/kg. One hour after vehicle, extract or drug reference administration, absolute ethanol was given orally to each mouse at a dose of 7 mL/kg of body weight. One hour and a half after ethanol administration, mice were killed using a CO_2 chamber. Each stomach was dissected out, inflated with 2 mL of 2% formalin and fixed in the same solution for 15 min. The stomachs were opened along the greater curvature, pressed between two glass plates, and scanned so that the lesions

could be counted with the aid of the ImageJ[®] software program. The sum of the area of all lesions in the corpus for each mouse was calculated and used as the ulcer index. At least three independent experiments were done.

2.7. Histology

For acute gastric ulcer samples, the glandular portion of the stomach (fixed in 2% neutral-buffered formalin) was embedded in paraffin wax, sectioned into sagittal 5 μ m sections and stained with hematoxylin-eosin (H&E) alcian blue (AA) or periodic acid Schiff (PAS), a representative area was selected for qualitative light microscopic analysis.

2.8. TPA-induced mouse ear edema

Ear edema was induced according to the method described by De Young et al. (1989) and modified by Payá et al. (1993) by topical application of TPA. Mice were divided into different groups ($n=4$). The assay consist in two application steps as follows: first application; edema was induced on the right ear by topical application of 10 μ L of a TPA solution (0.25 μ g/ μ L) and the left ear received a topical application of 10 μ L of 100% acetone. Second application; once vaporized the first application, the right ear received either 20 μ L of the assayed extract or reference drug (dissolved in the correspondent solvent) or solvent alone (see Section 2.1.). The tested doses for extracts were 0.1–3 mg/ear, and for the positive controls; Dexamethasone, or Indomethacin 0.05 mg/ear, or 0.5 mg/ear respectively. The left ear received 20 μ L of the same vehicle in which the treatment was dissolved. The left ear was used as a basal control.

Edema was expressed as the increase in ear thickness due to the inflammatory process. Ear thickness was measured before and after induction of the inflammatory response using a micrometer (Mitutoyo no. 293–831). The micrometer was applied near the tip of the ear just distal to the cartilaginous ridges and the thickness was recorded in μ m (De Young et al., 1989). At the end of the experiment, the animals were killed using a CO₂ chamber and 7 mm ear biopsies were obtained in order to determine the edema weight. At least three independent experiments were done.

2.9. Anti-*Helicobacter pylori* activity

2.9.1. Bacterial strain and culture conditions

H. pylori standard strain ATCC 43504 was grown on Casman agar base (BBL) plates supplemented with 5% defibrinated sheep blood, vancomycin (10 mg/L), trimethoprim (5 mg/L), amphotericin B (2 mg/L), and polymyxin B (2.5 mg/L) at 37 °C under microaerophilic conditions (10%CO₂). The strains were routinely identified by Gram staining morphology, biochemical tests (urease, oxidase and catalase positive), and PCR amplification (using *ureA*, and *cagA* primers). Stock cultures were stored at –70 °C in Brucella broth with 10% fetal bovine serum (GIBCO BRL) and 10% glycerol.

2.9.2. Minimum inhibitory concentration (MIC) determinations

Anti-*H. pylori* activity of all extracts and reference antibiotics (amoxicillin, clarithromycin and metronidazole) was tested with the broth dilution method based on the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recommendations, in Mueller–Hinton broth (DIFCO), 0.2% β -cyclodextrin, 10 mg/L vancomycin, 5 mg/L trimethoprim, 2 mg/L amphotericin B, 2.5 mg/L polymyxin B, and incubated under gentle shaking (150 rpm) for the time the experiment lasted at 37 °C under microaerophilic conditions. Extracts were dissolved in DMSO to give final concentrations in

the culture of 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.81 and 3.6 μ g/mL. These dilutions (in a volume of 10 μ L DMSO) were added to 1.5 mL of *H. pylori* broth culture at the beginning of the exponential growth phase ($\sim 10^8$ CFU/mL). ΔA_{660} was determined after 24 h of incubation and was used to calculate the percentage of growth inhibition with respect to a control that grew only with DMSO (0.66% final concentration, which does not have any effect on bacterial growth). All the experiments were performed in triplicate and at least three independent experiments were recorded. MIC was defined as the lowest tested treatment concentration that inhibits 100% bacterial growth.

2.10. Statistical analysis

Gastroprotective and anti-edematogenic activity data are presented as the mean \pm SEM of $n \geq 8$ mice per group. Statistically significant differences between the treatments were tested by ANOVA analysis followed by Dunnett's test; $P < 0.05$ was considered statistically significant. Prisma Graph-Pad[®] (version 5.0) software was used for statistics and plotting.

3. Results and discussion

There are few studies that have explored single properties of the *C. procera* bark (Canales et al., 2005; Castillo-Juárez et al., 2009; Rosas-Acevedo et al., 2011); nevertheless, none of them has tried to see *C. procera* bark from an integral point of view, for the future development of an effective complementary therapy for the treatment of gastric ulcer and gastritis, whether or not *H. pylori* is the etiological agent.

With this perspective in mind, we designed an experimental strategy to study the bark whole polarity spectrum, with respect to some basic ulcer-related pharmacological parameters (anti-*H. pylori*, antiulcerogenic and anti-inflammatory activities), and toxicity in order to identify the biologically active regions.

3.1. Acute toxicity in vivo

Investigation of acute toxicity is the first step in the toxicological analysis of herbal drugs. In this study, Lorke's procedure was selected because it offers the advantage that adequate information is obtained using only 24 animals irrespective of the type of material tested and the administration route selected. Medium lethal dose (LD₅₀) values are calculated using the geometric mean or the doses for which 0/3 and 3/3 deaths could be found. LD₅₀ > 5000 mg/kg is regarded according to Lorke protocol as non-toxic.

On the other hand, in order to develop the acute pharmacological models in mice, it was indispensable to warrant the security of the 5 extracts knowing its acute toxicity and its lethality.

During the first phase of the evaluation, all the animals administered with 10, 100, or 1000 mg/kg of the 5 different extracts did not die; hence during the second phase, the doses evaluated were 1600, 2900 and 5000 mg/kg. Again, none of the animals died. Therefore, the LD₅₀ in mice for the 5 extracts of *C. procera* was estimated to be > 5000 mg/kg. In addition, the animals did not show important changes on behavior (i. e. ataxia, hyperactivity or, hypoactivity), body weight or macroscopic morphology of heart, liver, kidney and lungs between the negative control and experimental groups during the experimental time (data not shown).

This is the first animal acute toxicity evaluation made which demonstrates the safety of *C. procera* bark extracts and is a precedent to continue with the pharmacological studies. Previously, in 2006, Rodríguez-López et al. reported that, the hexane,

CH₂Cl₂, and acetone extracts of *C. procera* bark displayed a significant toxicity on brine shrimp (*Artemia salina* Leach, BSLT), LC₅₀ were 0.21, 2.31, and 22.75 ppm, respectively. It is very difficult to make a comparison between the results obtained in these two models, since there are big differences between these species (*A. salina* and *Mus musculus*). For our purposes, the mice model is more appropriate because, in making an extrapolation of results to humans, the physiological, biochemical, and anatomical differences are less. Additionally, rodent models are routinely and widely employed for pharmacological studies.

3.2. Anti-ulcerogenic activity

Regardless of gastric ulcer etiology, it is generally accepted that it is the result of an imbalance between aggressive factors and maintenance of the mucosal integrity through an endogenous defense mechanism. Acute ethanol-induced gastric ulcer model has been widely used for the experimental evaluation of antiulcer activity. Disturbances in gastric secretion, damage to gastric mucosa, alterations in permeability, gastric mucus depletion and free radical production are reported as the pathogenic effects of ethanol (Bucciarelli and Skliar (2007)). A candidate for an effective therapy against gastric ulcer should basically act, either by reducing the aggressive factors on gastric mucosa, or by increasing mucosal resistance to them. This model is suitable to test our different extracts since treatments may be administered orally and because a broad range of doses can be tested.

Once the safe dose was ascertained by acute oral administration, we proceeded with the gastroprotective activity evaluation of the 5 extracts using the acute ethanol-induced gastric ulcer model.

HX, MET and AQ extracts were active in a dose-dependent manner as shown in Fig. 1. Pharmacological studies showed that the MET, HX, and AQ, have statistically significant gastroprotective effect in terms of the length and number of gastric ulcers, compared with the vehicle (negative control) ($p \leq 0.05$); with $86.04 \pm 3.52\%$, $81.40 \pm 5.38\%$, and $72.56 \pm 8.3\%$ of maximum gastroprotection at 300 mg/kg for MET, HX, and AQ extract, respectively (Fig. 1, B, A and C, see Figs. 2A, 3A, and 4A for a macroscopic view). The fact that AQ has a significant gastroprotective activity is a relevant contribution to the ethnopharmacological knowledge of this species, since aqueous preparations are the common way by which people use the bark to treat digestive disorders, and this is the first time that this property is reported for the extract.

The medium effective dose (ED₅₀) determined for each extract is presented in Table 1. It is noticeable that, comparing MET and HX extracts with the positive reference control, the ED₅₀ values are 2.2 and 4.4 fold higher than the one for carbenoxolone, a pure reference drug, pointing out that these extracts could be a potential source of gastroprotective novel compounds. When low dosages of AQ were administered (0.1 and 1 mg/kg) no antiulcerogenic activity was observed; therefore, its determined DE₅₀ was one magnitude order higher than HX and MET.

A previous study reported antiulcer activity of some *C. procera* bark extracts in an *in vivo* rat absolute ethanol-induced gastric ulcer model. The only determined ED₅₀ was for MET extract (~40 mg/kg), which is higher than our value (0.53 mg/kg), and also reported less gastroprotection for ethyl acetate and HX extracts (Rosas-Acevedo et al., 2011). There are many factors that could explain the differences with our results: plant origin, collection season, extraction process, and the animal model used. Nevertheless, their results correlated with ours in that HX and MET extracts present antiulcerogenic activity.

The objective of this study was to assay the preventive activity of the extracts against ethanol-induced ulceration; however complementary assays must be done in order to test their effectiveness in ulcer healing and resolution.

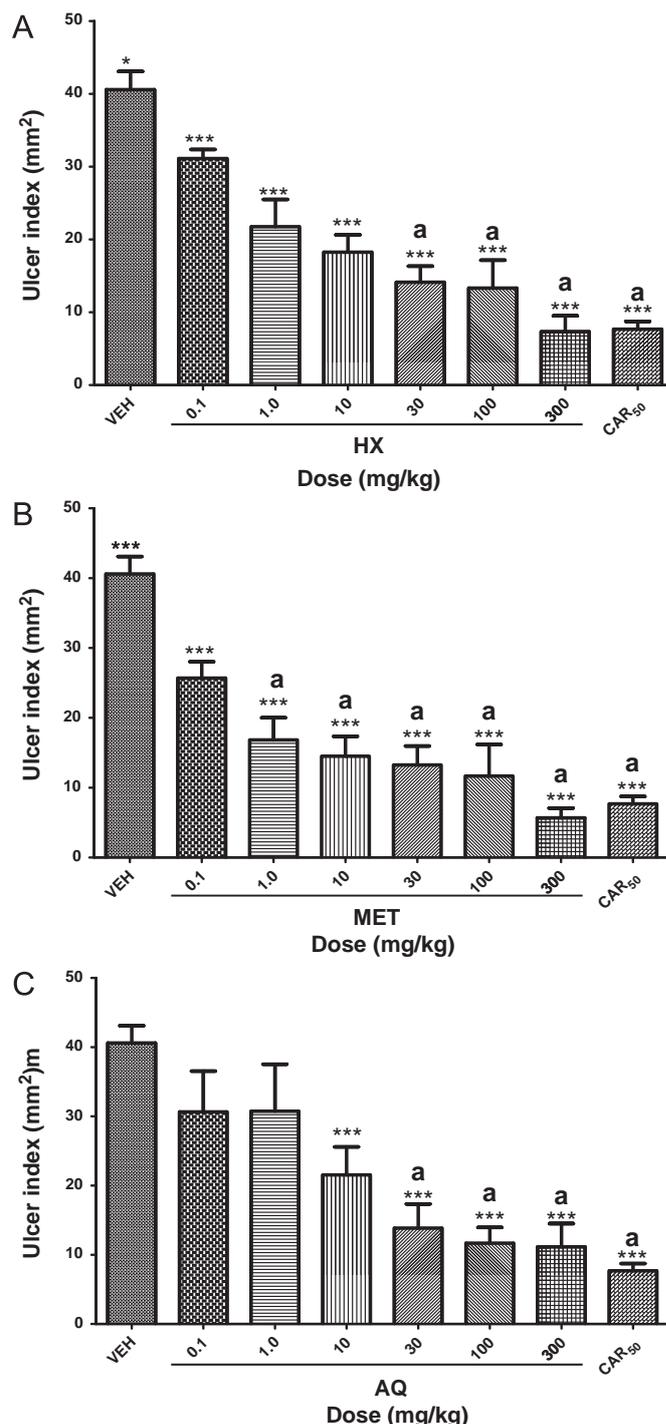


Fig. 1. Anti-ulcerogenic effect of *C. procera* bark extracts in the acute ethanol-induced gastric ulcer model. HX (A), MET (B) and AQ (C) extracts. VEH, vehicle 10% tween 80 in saline or saline alone. CAR₅₀, carbenoxolone at a dose of 50 mg/kg (positive reference control). At least three replicates of each experiment were performed. Data are presented as the mean \pm S. E. M. of $n \geq 8$. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$. Kruskal-Wallis ANOVA on ranks analysis. *a* denotes non-significant statistical differences between treatments and positive reference control at $p \leq 0.05$.

3.2.1. Histopathological analysis

It was relevant to compare the previous gastroprotective results with the histopathological analysis in order to determine if there was a relationship between them. The histopathological examination was performed only to mice stomachs receiving

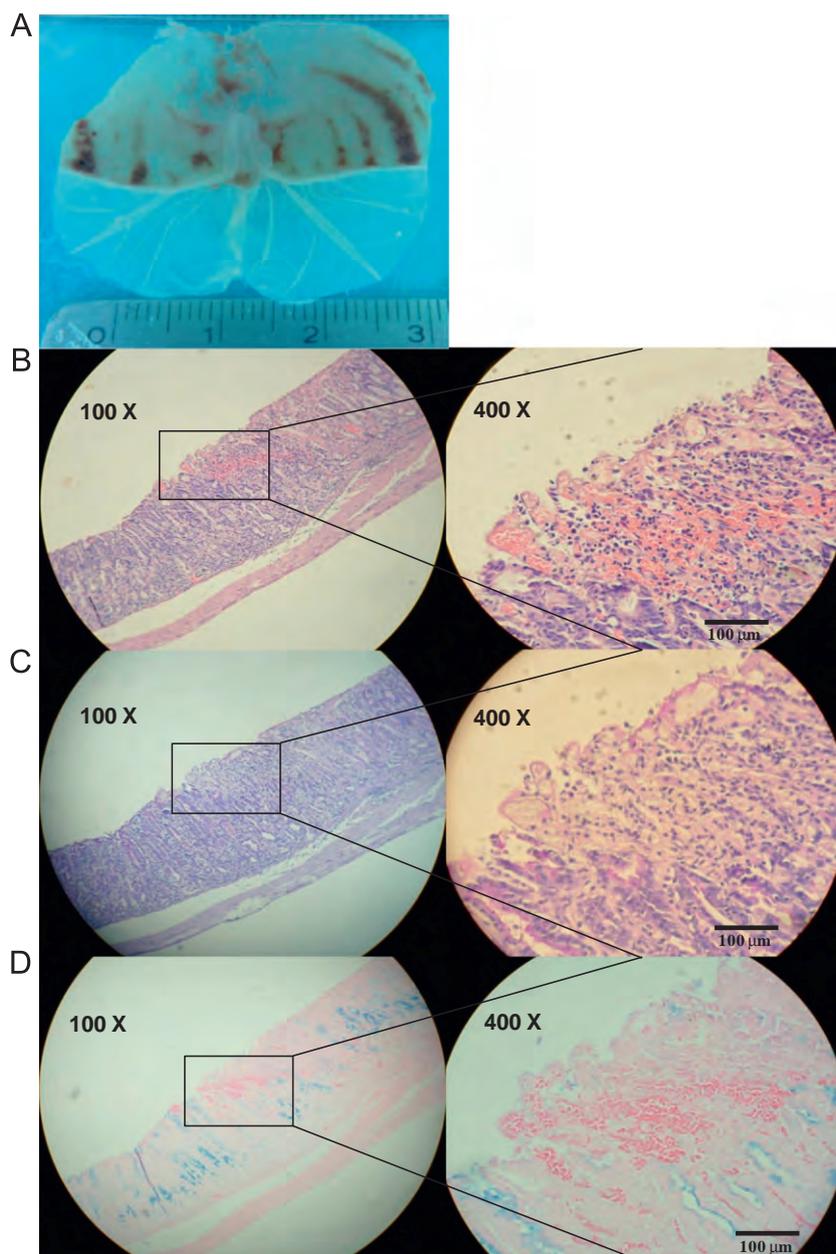


Fig. 2. Negative control. Mice treated with only the vehicle in the absolute ethanol-induced gastric ulcer model. (A) Macroscopic appearance of the stomach. (B) (C) and (D), observations of sagittal sections of 5 μm thickness of the glandular portion of the stomach at 100 X and 400 X amplifications. (B) Histopathological view with H&E staining. (C) Histochemical PAS staining. (D) Histochemical AB staining.

saline as negative control, (Fig. 2), 50 mg/kg of carbenoxolone as positive control, 300 mg/kg of AQ, MET (Fig. 3), and HX (Fig. 4) extracts, and non-treated mice. See supplementary Figs. 6–8 and Table II for the macroscopic and microscopic results of all extracts and controls; and, histopathological and histochemical analysis.

The integrity of the mucosa of mice pretreated with MET extract was almost completely preserved with respect to normal tissue appearance. Very low infiltration of blood cells was observed, which is indicative of the absence of ulceration and bleeding; in addition, the presence of moderate inflammatory infiltrate is indicative that ethanol injury was somehow diminished considerably due to the presence of the extract (Fig. 3 B).

As for histochemical staining, significantly high PAS positivity was observed (denoted by fuchsia color presence), which means a neutral mucus production by the mucosa (Fig. 3C). On the other

hand, AB staining showed very low positivity (denoted by blue color presence), indicating almost null acid mucus production (Fig. 3 D). Similar observations were obtained for the tissues receiving AQ extract or carbenoxolone as pretreatment, with the exception that in the first case, gastroprotection was in lesser extent. Since one of the most important mechanisms of action of carbenoxolone is the production of prostaglandins, which is closely linked to the production of gastric mucus (Simmons et al., 2004; Gyires, 2005), we suggest that MET and AQ extracts may act by increasing the production of prostaglandins; however, additional specific tests should be performed to determine this phenomenon.

In contrast, as for HX extract, the histochemical analysis revealed a highly significant AB positivity (Fig. 4D) and moderate PAS positivity (Fig. 4C), showing high acid mucus production and

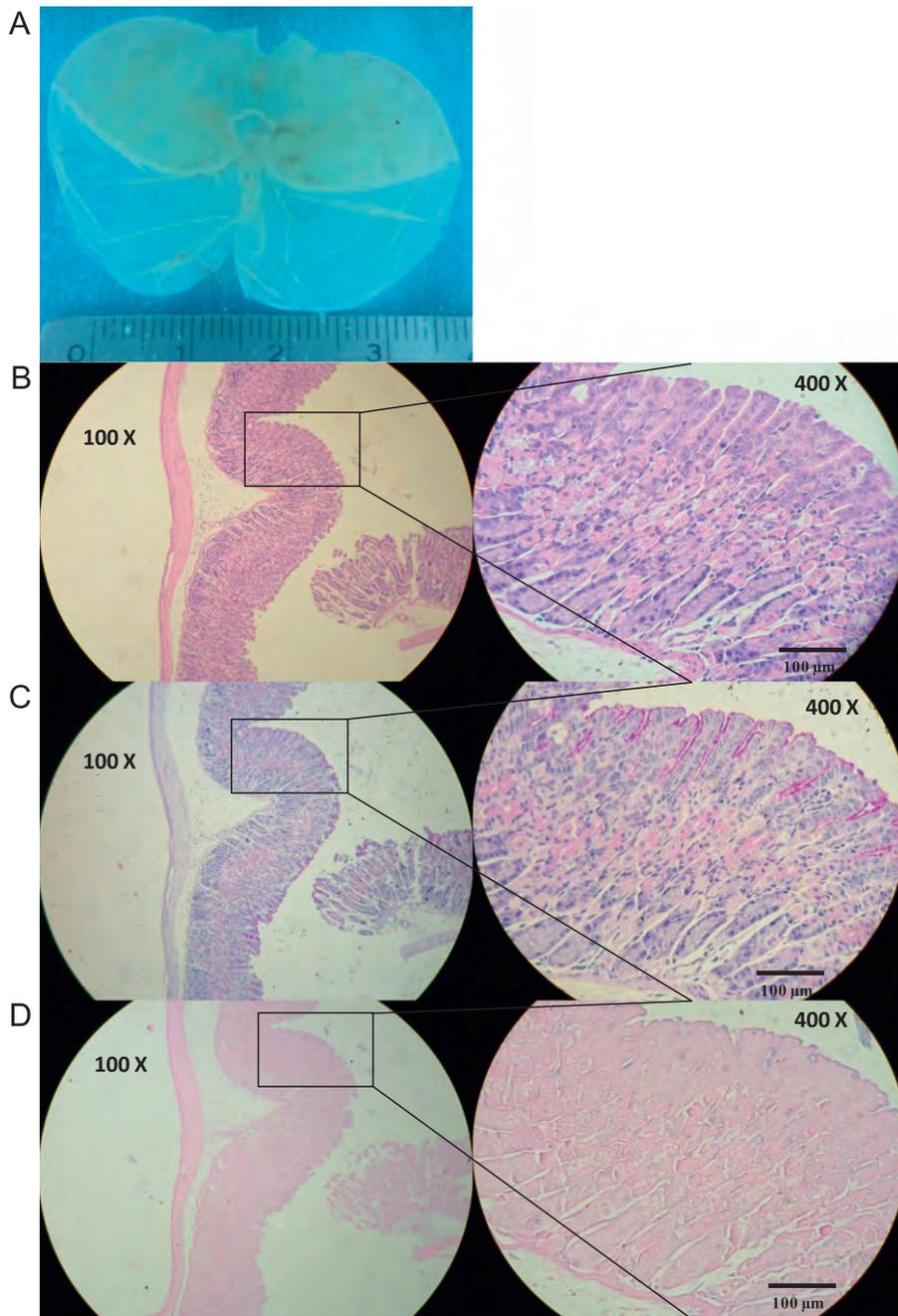


Fig. 3. Mice treated with the MET extract (300 mg/kg) in the absolute ethanol-induced gastric ulcer model. (A) Macroscopic appearance of the stomach. B, C and D, observations of sagittal sections of 5 μm thickness of the glandular portion of stomach at 100 X and 400X amplifications. (B) Histopathological view with H&E staining. (C) Histochemical PAS staining. (D) Histochemical AB staining.

reasonable neutral mucus production, although the macroscopic analysis showed good gastroprotective effect (Fig. 4A). If we compare the AB observations with the negative control, that also showed strong AB positivity (Figs. 2D and 4D), the histochemical observation appears to be the same; however, the mucosal integrity was preserved, and very low blood and inflammatory cell infiltration were found (Fig. 4B).

PAS and AB histochemical observations indicate that perhaps the HX extract has an additional mechanism of action in comparison with MET and AQ extracts. This possibility is very high due to the different polarity of the extracts. The thin layer chromatographic analysis showed markedly dissimilar metabolic profiles among them (data not shown), suggesting that the gastroprotection is conferred to different kinds of compounds.

The weakening of gastric mucosal defense is intimately associated with the diminished viscoelastic qualities of mucus, decrease in hydrogen ion retardation capacity, and the extensive peptic erosion. An increase in the production of gastric mucus, one of the most important defense mechanisms, may efficiently reduce these effects. Apparently, MET and AQ extracts act this way.

3.3. Anti-edematogenic activity

The TPA-induced edema test is a screening method to evaluate the ability of compounds to prevent an inflammatory reaction in response to a phlogistic agent. This model has certain advantages for natural product testing. First, the response is local, and

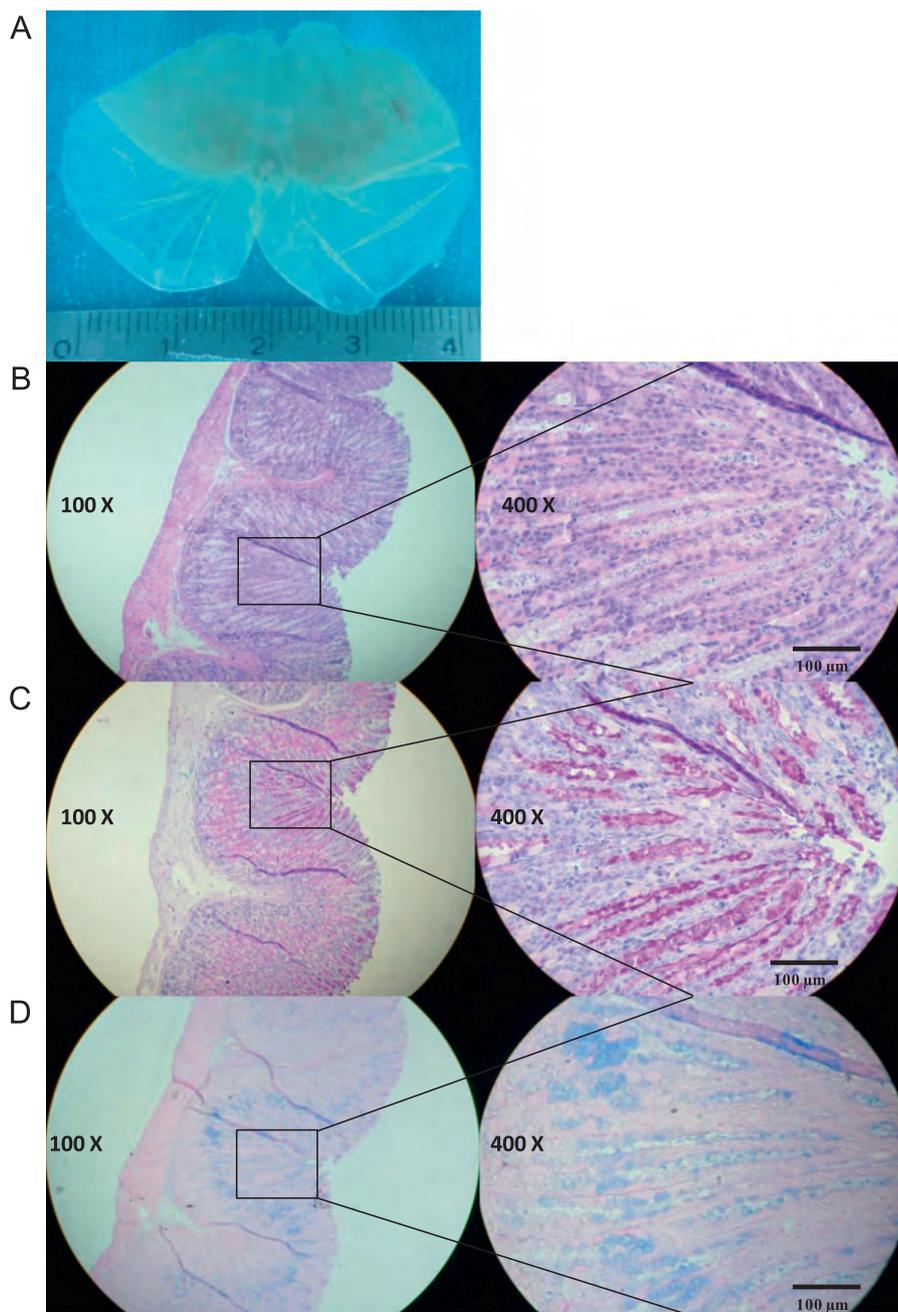


Fig. 4. Mice treated with the HX extract (300 mg/kg) in the absolute ethanol-induced gastric ulcer model. (A) Macroscopic appearance of the stomach. (B), (C and D), observations of sagittal sections of 5 μm thickness of the glandular portion of the stomach at 100 X and 400 X amplifications. (B) Histopathological view with H&E staining. (C) Histochemical PAS staining. (D) Histochemical AB staining.

involves the skin of the ear, thus, topical application avoids drug metabolism and excretion. Secondly, this model uses very small amounts of the drug. It is known that phorbol esters, such as TPA induce skin inflammation and a hyperproliferative response with an infiltration of neutrophils (De Young et al., 1989). It is also known that TPA stimulates PLA_2 , conducting to the release of arachidonic acid (AA), leading to prostaglandin production (Fuerstenberger et al., 1981); hence, inhibitors of these molecules reduce TPA-induced edema and, as a consequence, this model has been extensively used to assess these kinds of compounds. Inflammation by TPA also seems to be related to the release of other non-eicosanoid mediators (De Young et al., 1989).

The present study has demonstrated in an acute model, that HX extracts have significant anti-edematogenic activity in a dose-

response relationship, with a maximal of 57.45% edema inhibition with 3.0 mg/ear (Fig. 5). The topical application of HX extract, significantly reduced ($p \leq 0.05$) the acute ear edema induced by TPA with an $ED_{50} = 1.75$ mg/ear. The others extracts did not reach 50% inhibition of ear edema, even at the highest dose tested (Table 1). DM-MET, MET, and AQ extracts could not be assayed at doses higher than 1 mg/ear because of solubility problems.

This is the first report of anti-inflammatory activity of *C. procera*. It is noticeable that the greatest effect was observed with the HX extract, suggesting a better internalization through the skin, due to its low polarity.

Edema inhibition by HX extract suggests that the prostaglandin pathway of inflammation is involved, and could be that COX-1 or COX-2, or both, are the potential targets; however, the

Table 1
Summary of results obtained for *C. procera* bark.

Extract	Yield (%)	Activity			
		^a Acute toxicity LD ₅₀ (mg/kg)	^b Anti- <i>H. pylori</i> MIC(μg/mL)	^c Anti-inflammatory ED ₅₀ (mg/ear)	^d Gastroprotective ED ₅₀ (mg/kg)
HX	0.90		7.81	1.75	1.06
DM	1.07	> 5,000 for the 5 extracts	15.6	> 3	> 300
DM-MET	12.80		62.5	> 1	> 300
MET	13.22		62.5	> 1	0.53
AQ	17.74		125	> 1	11.30
Positive Reference Controls			Metronidazole: 300 Clarithromycin: 0.5 Amoxicillin: 0.05	Dexamethasone: 0.05 Indomethacin: 0.5	Carbenoxolone: 0.24

Data presented are the result of

^a assay: one experiment with $n=3$ as Lorke indicates.

^b assay: MICs values were obtained from at least three independent experiments by triplicate.

^c assays: at least three replicates of each experiment with $n \geq 8$.

^d assays: at least three replicates of each experiment with $n \geq 8$.

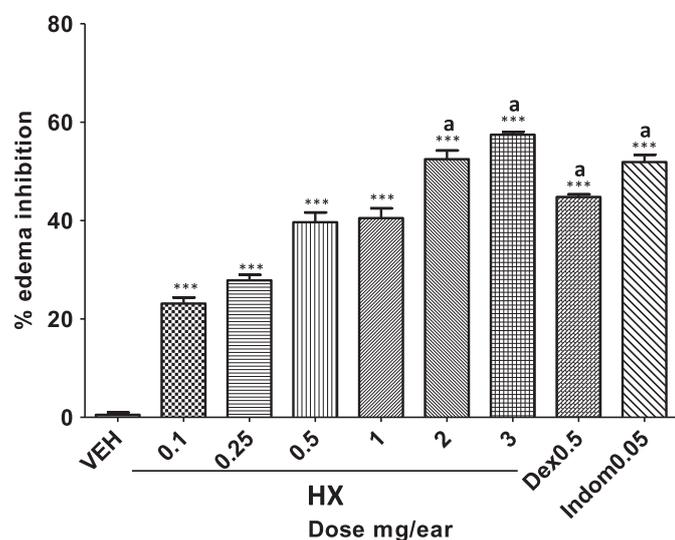


Fig. 5. Anti-edematogenic effect of HX extract of *C. procera* bark in the acute TPA-induced ear edema model. VEH, vehicle acetone or 50% acetone. Dex_{0.05}, dexamethasone 0.05 mg/ear, and Indom_{0.05}, indomethacin 0.5 mg/ear (positive reference controls). At least three replicates of each experiment were performed. Data are presented as the mean \pm S. E. M. of $n \geq 8$. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$. ANOVA analysis was performed. *a* denotes non-significant statistical differences between treatments and positive reference controls $p > 0.05$.

precise mechanism of anti-inflammatory action of the extract remains to be elucidated; as well as the isolation of the active(s) molecule(s).

Although the HX extract ED₅₀ is only 3.5-fold higher than the one obtained with indomethacin, some authors suggest that values over 1.0 mg/ear are not enough interesting to continue the purification of active components (Yuan, et al., 2006); nevertheless, it has to be considered that this is a crude extract and indomethacin is a pure compound. On the other hand, we must notice that in this work we tested an acute edema topical model, so it is important to explore a chronic one and different administration routes in order to determine its therapeutic anti-edematogenic potential. Finally, it should be taken into account that this is another pharmacological property to be added to *C. procera* bark.

3.4. Anti-*H. pylori* activity

Considering that *H. pylori* is the etiological agent of chronic gastritis and is responsible for 85% of gastric ulcers, the anti-*H.*

pylori activity of the different extracts of *C. procera* bark must be analyzed. In order to identify their antibiotic potential, minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using the broth dilution method. The results showed that HX extract exerts the highest inhibitory effect against *H. pylori* (MIC=7.8 μg/mL), followed by DM (MIC=15.6 μg/mL), DM-MET (MIC=62.5 μg/mL), and MET (MIC=62.5 μg/mL) extracts, the AQ extract had the lowest activity (MIC=125 μg/mL) (Table 1, and see supplementary material Fig. 9 for inhibition patterns). Anti-*H. pylori* activity of the 5 extracts was more effective than that of metronidazole but less effective than that of amoxicillin and clarithromycin (Table 1, and see supplementary material Fig. 9).

The fact that the four organic extracts and the aqueous infusion of *C. procera* bark showed remarkable activities against *H. pylori*, suggests that many structurally different compounds could be responsible for the action. Nevertheless, the MIC value of HX extract indicates that this fraction would contain the most active substances.

Previously, our group reported the anti-*H. pylori* activity of methanolic and aqueous extracts of *C. procera* bark, MIC=500 and 250 μg/mL, respectively (Castillo-Juárez et al., 2009). These values are very high in comparison with the results shown in this work. It is possible that these differences are mainly due to the extraction process and plant origin. The bark used in this work was collected in March at the Municipality of Jojutla, Morelos, and once dried, it was ground and extracted exhaustively, and in the case of the AQ extract, an infusion was prepared; whereas in the previous work, the bark was collected in November at a different locality (Tlacozotitla; Guerrero), and the dried bark was just cut in medium size pieces and extracted, and for the AQ extract, a decoction was prepared. As a result, in the present work the quality and efficiency of the extraction was better and is reflected in a higher anti-*H. pylori* activity. Furthermore, this is a more complete work because it evaluates all the polarity ranges.

The antibiotic activity found for all *C. procera* extracts in this study is basic for future experiments which might allow us to determine if one or more of these extracts is able to eradicate the bacteria in an *in vivo* infection model. The eradication of *H. pylori* is important to accelerate the healing and prevent the relapse of bacterial related diseases, mainly peptic ulcer and gastritis.

Summarizing, we have found that HX extract has 3/3 of the tested biological activities and does not show acute toxicity. Therefore, it would be a good candidate to continue with further pharmacological studies; however its low yield is a strong limitation. Independent of that, its highest MIC against *H. pylori* makes it worthwhile to continue with the bioguided isolation of

the anti-*H. pylori* compounds. On the other hand, the MET extract was not toxic under acute administration, and showed only anti-*H. pylori* activity and antiulcer effect; nevertheless, its high yield as well as its remarkable gastroprotective activity makes it a good candidate for the isolation of gastroprotective compounds and for further clinical studies. We are currently working on the isolation and identification of the anti-*H. pylori* and antiulcerogenic active metabolites, as well as on the study of the gastroprotective mechanism of action, healing effect and chronic toxicity of MET extract.

C. procera bark has been used in Mexico since prehispanic times to treat gastrointestinal diseases. Due to its similar appearance, its use to adulterate the *Amphipterygium adstringens* bark, one of the most important and commercialized Mexican medicinal plants used to treat gastritis, gastric ulcer, and stomach cancer, has been reported recently (Argueta et al., 1994; Hersch-Martínez, 1995). Our results indicate that *C. procera* bark has many biological activities that probably act in a synergistic way when people consume the bark for the treatment of gastritis or peptic ulcer (with or without bacterial origin). Hence, the present findings partially validate the use of this species to treat gastric diseases. Nevertheless, further *in vivo* and clinical studies, as well as chronic toxicity studies, are required to scientifically support its traditional use.

4. Conclusions

Plant extracts constitute important sources of biologically active compounds, but the polypharmacological approach is emerging as a hot topic. In this work we are demonstrating the *in vivo* antiulcerogenic and anti-inflammatory potential, as well as the *in vitro* anti-*H. pylori* activity of *C. procera* extracts. Its safety in the tested *in vivo* model has also been shown. We conclude that the hexane extract has the best polypharmacological properties, followed by the methanolic extract.

Considering all the results obtained here, we can state that *C. procera* bark, as a whole entity, has polypharmacological activities, somehow validating the traditional use of this species.

Taking into account the problems of *H. pylori* associated diseases therapies; the polypharmacological characteristics of *C. procera* demonstrated herein, increases its clinical value, or the value of some of its extracts. Therefore, it is promising to develop an integral treatment for gastritis or peptic ulcer whether related or not to *H. pylori*.

Acknowledgments

Partially supported by DGAPA-UNAM IN225711. We thank Mtra. Rosa María Fonseca, Fac. de Ciencias, UNAM, for her support in the collection and identification of *C. procera*; Dr. Armando Pérez Torres, Depto. de Biología Celular y Tisular, Fac. Medicina, UNAM for his critical feedback on the histopathological analysis, and Veronica Rodriguez Mata and Ricardo Hernandez Trujillo for the histological-technical assistance. We also thank Drs. Rebeca Romero-Álvarez and José Luis Pérez-García for reviewing the

proper usage of English and Emmanuel Ramirez Ortega for the photographic assistance. To Universidad Nacional Autónoma de México, to the Doctorate in Biomedical Science and CONACyT for the support granted to WIE-H (no. of registry 266460). JFP-E is a DGAPA-UNAM postdoctoral fellow.

Appendix A. Supporting information

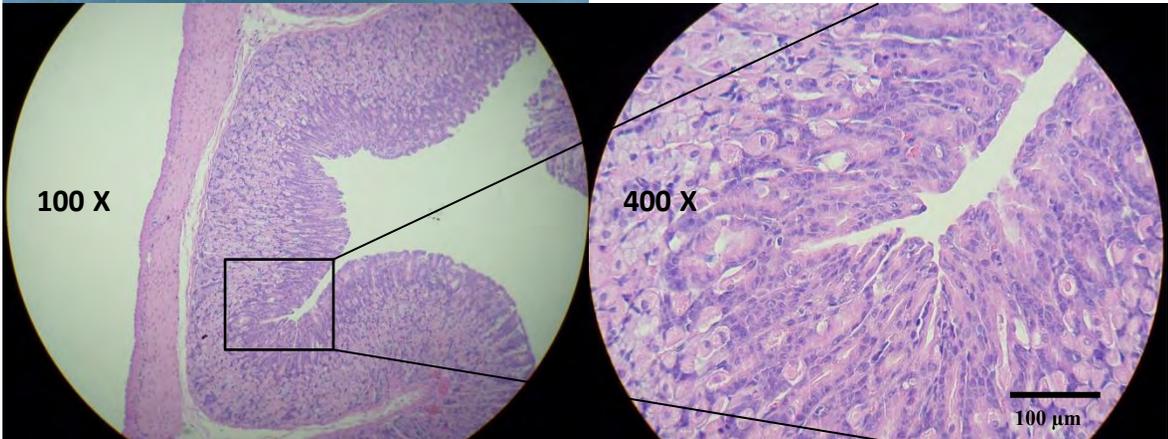
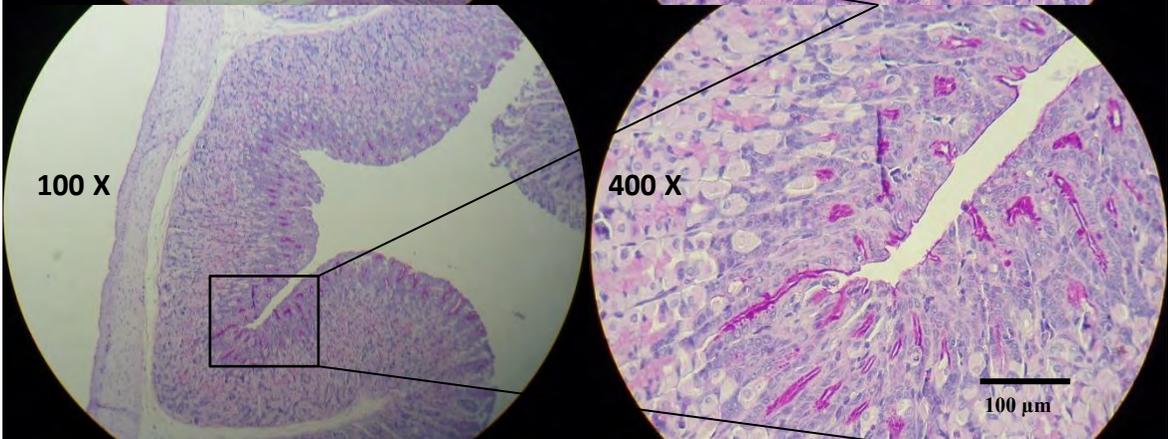
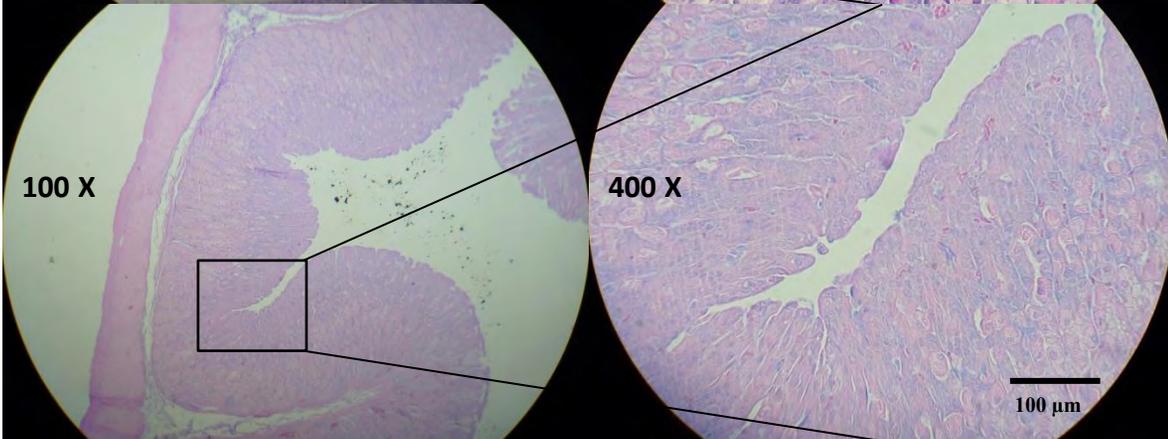
Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.07.001>

References

- Argueta, V., Cano, J., Rodarte, M., 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana, I. Instituto Nacional Indigenista, México.
- Atherton, J.C., 2006. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastroduodenal diseases. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease 1, 63–96.
- Bucciarelli, A., Skliar, M.I., 2007. Medicinal plants from Argentina with gastroprotective activity. Ars Pharmaceutica 48, 361–369.
- Canales, M., Hernández, T., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Avila, G., Durán, A., Lira, R., 2005. Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. Journal of Ethnopharmacology 97, 429–439.
- Canales, M., Hernández, T., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Durán, A., Lira, R., 2006. Análisis Cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacan-Cuicatlán, Puebla, México. Acta Botánica Mexicana 75, 21–43.
- Castillo-Juárez, I., González, V., Jaime-Aguilar, H., Martínez, G., Linares, E., Bye, R., Romero, I., 2009. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. Journal of Ethnopharmacology 122, 402–405.
- De Young, L.M., Kheifets, J.B., Ballaron, S.J., Young, J.M., 1989. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacological agents. Agents and Action 26, 335–341.
- Fuerstenberger, G., Richter, H., Fusenig, N.E., Marks, F., 1981. Arachidonic acid and prostaglandin [E.sub.2] release and enhanced cell proliferation induced by the phorbol ester TPA in a murine epidermal cell line. Cancer Letters 11, 191–198.
- Gyires, K., 2005. Gastric Mucosal Protection: From Prostaglandins to Gene-Therapy. Current Medicinal Chemistry 12, 203–215.
- Hersch-Martínez, P., 1995. Commercialization of medicinal plants from southwest Puebla, México. Economic Botany 49, 197–206.
- Lorke, D., 1983. A new approach to partial acute toxicity testing. Archives of Toxicology 54, 275–287.
- Payá, M., Ferrándiz, M.L., Sanz, M.J., Bustos, G., Blasco, R., Ríos, J.L., et al., 1993. Study of the antioedema activity of some seaweed and sponge extracts from the mediterranean coast in mice. Phytotherapy Research 7, 159–162.
- Rodríguez-López, V., Salazar, L., Estrada, S., 2003. Spasmolytic activity of several extracts obtained from some Mexican medicinal plants. Fitoterapia 74, 725–728.
- Rodríguez-López, V., Aguirre-Crespo, F., Salazar, L., Estrada-Soto, S., 2006. Identification of fatty acid esters and hydrocarbon derivatives from *Cyrtocarpa procera* by GC–MS. Natural Products Research 20, 1–7.
- Rosas-Acevedo, H., Terrazas, T., González-Trujano, M.E., Guzmán, Y., Soto-Hernández, M., 2011. Anti-ulcer activity of *Cyrtocarpa procera* analogous to that of *Amphipterygium adstringens*, both assayed on the experimental gastric injury in rats. Journal of Ethnopharmacology 134, 67–73.
- Simmons, D.L., Botting, R.M., Timothy, H.L.A., 2004. Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. Pharmacological Reviews 56, 387–437.
- WHO, 2005. National policy on traditional medicine and regulation of herbal medicines: Report of a WHO global survey. WHO press, France.
- Yuan, G., Wahlqvist, M.L., He, G., Yang, M., Li, D., 2006. Natural products and anti-inflammatory activity. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition 15, 143–152.

A

Figure 6. Mice treated with the AQ extract (300 mg/kg) in the absolute ethanol-induced gastric injury model. **A** Macroscopic appearance of the stomach. **B, C** and **D**, observations of sagittal sections of 5 μm thickness of the glandular portion of the stomach at 100X and 400X amplifications. **B** Histopathological view with H & E staining. **C** Histochemical PAS staining analysis. **D** Histochemical AB staining analysis.

B**C****D**

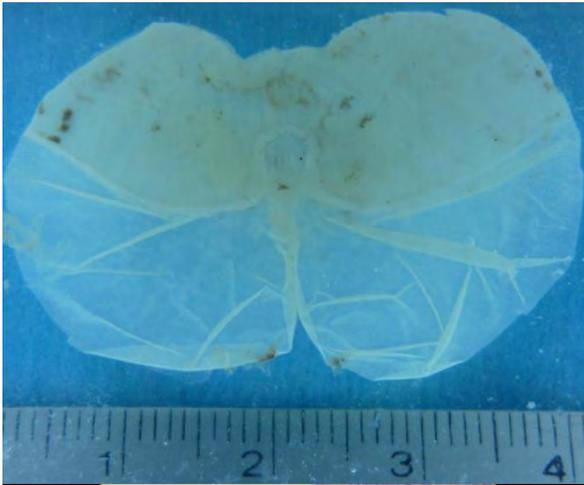
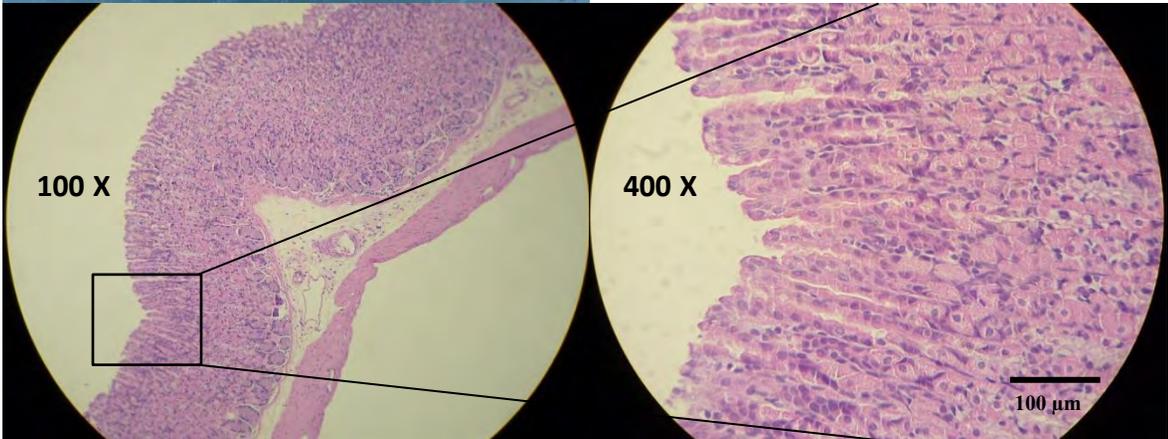
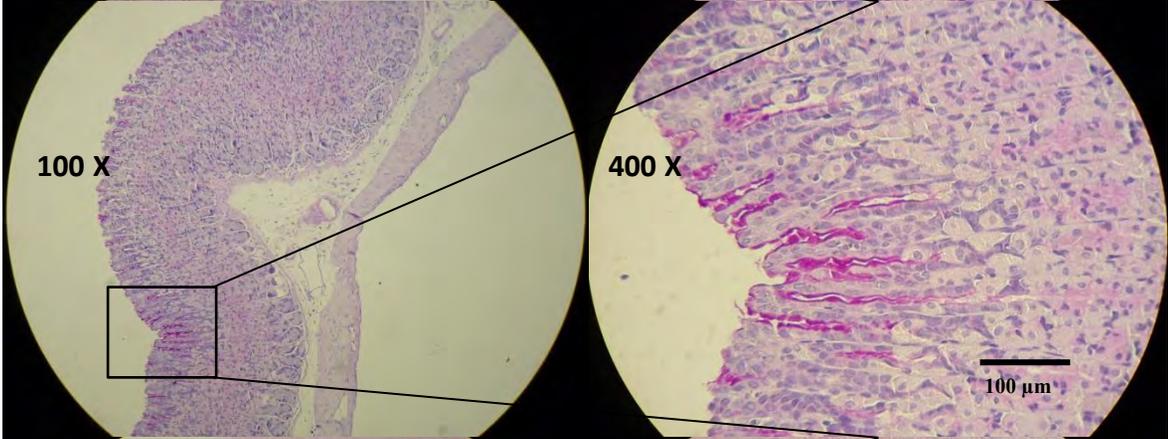
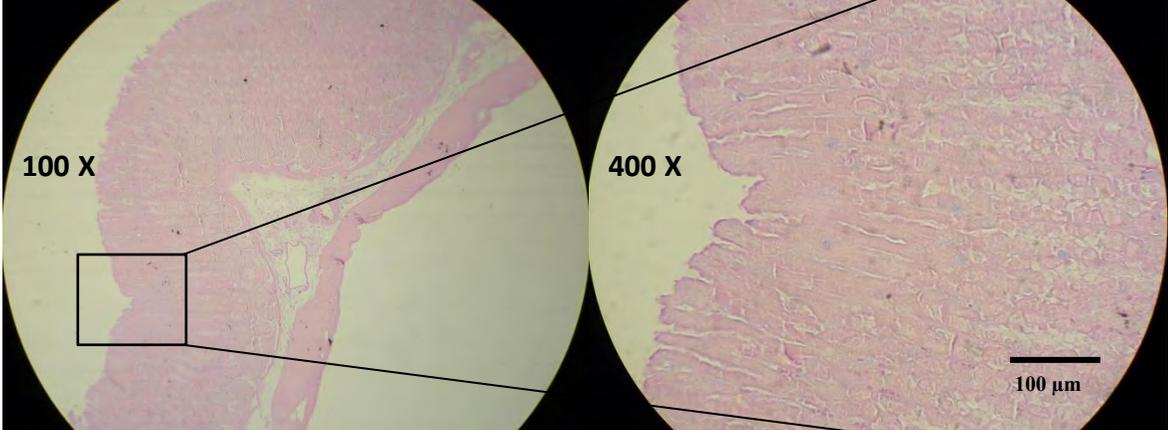
A

Figure 7. Mice treated with CAR (50 mg/kg) in the absolute ethanol-induced gastric injury model. **A** Macroscopic appearance of the stomach. **B, C** and **D**, observations of sagittal sections of 5 μ m thickness of the glandular portion of the stomach at 100X and 400X amplifications. **B** Histopathological view with H & E staining. **C** Histochemical PAS staining analysis. **D** Histochemical AB staining analysis.

B**C****D**

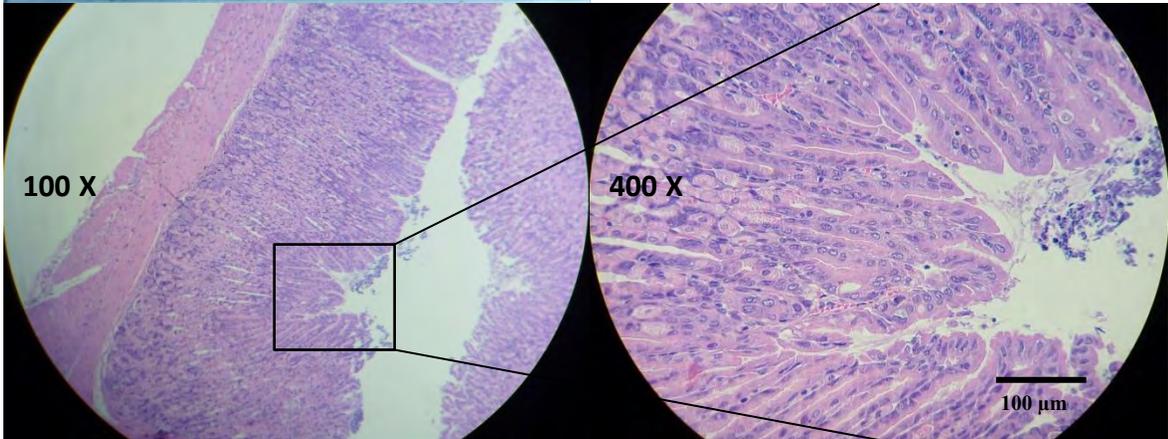
A



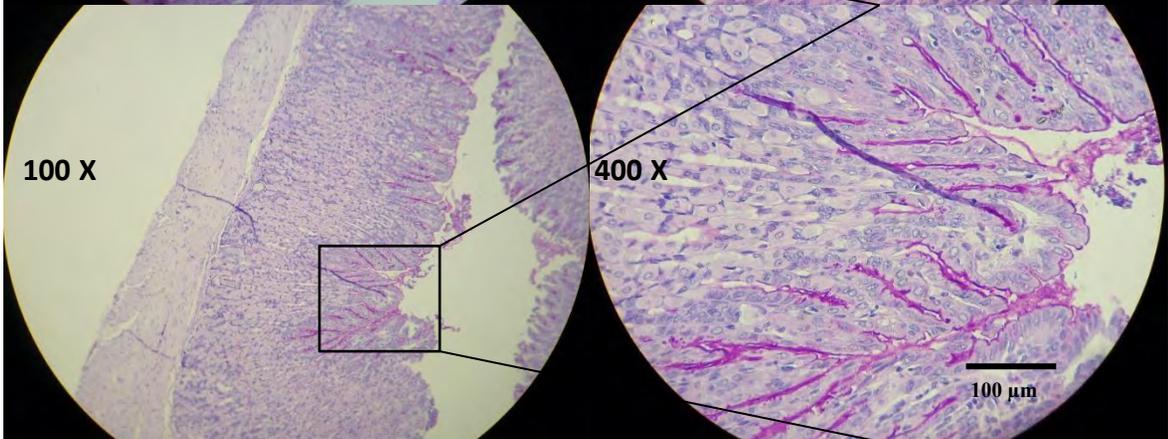
Figure 8. Non-treated mice.

A Macroscopic appearance of the stomach. **B**, **C** and **D**, observations of sagittal sections of 5 μm thickness of the glandular portion of the stomach at 100X and 400X amplifications. **B** Histopathological view with H & E staining. **C** Histochemical PAS staining analysis. **D** Histochemical AB staining analysis.

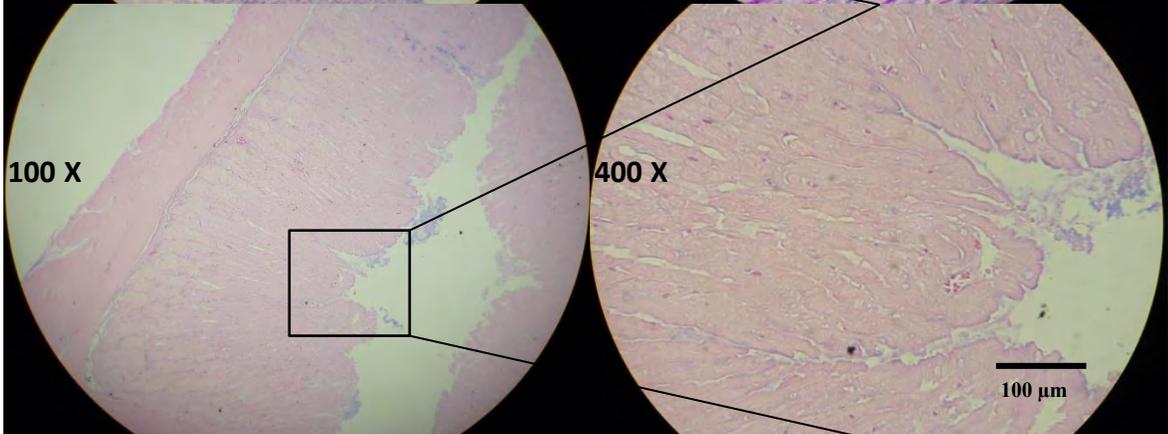
B



C



D



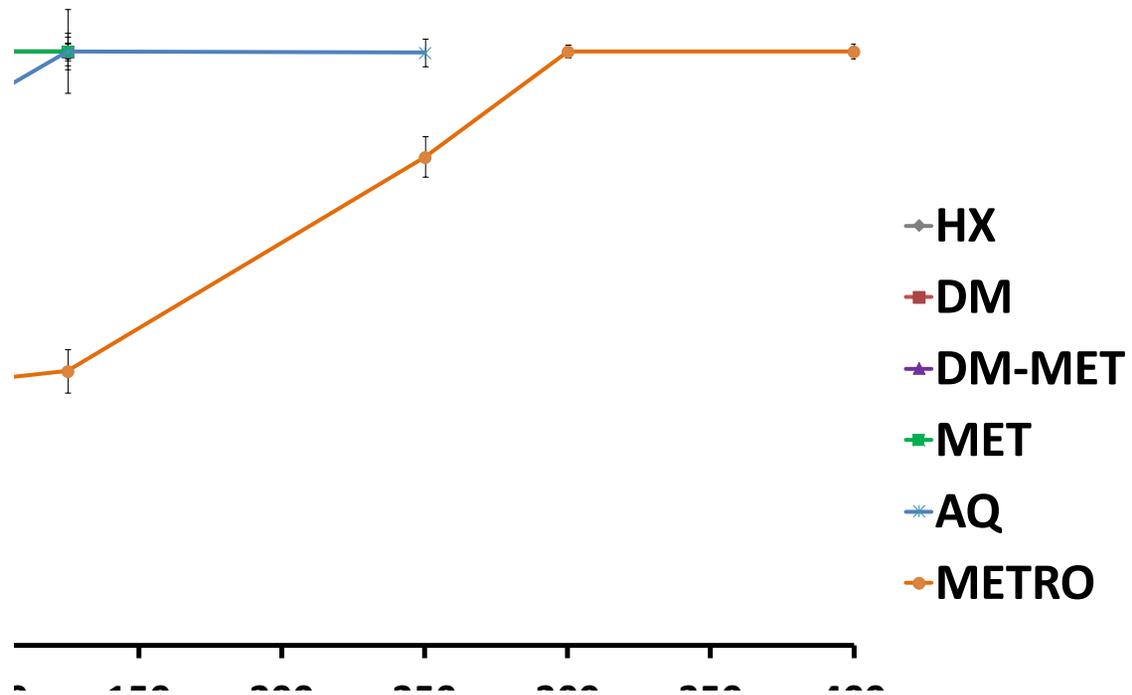


Figure 9. Effect of *C. procera* extracts upon *H. pylori* growth. Data are presented as the mean \pm S. E. M. Each experiment was recorded by triplicate and at least three independent experiments for each tested sample were done. METRO = metronidazole as a reference control.

Table II. Summary of histopathological and histochemical analysis of gastroprotection experiments.

TREATMENT	STAIN				
	H&E			PAS	AB
	TISSUE INTEGRITY	ERITROCITARY INFILTRATION	INFLAMMATORY INFILTRATION		
Normal	++++	-	+	++	-
VEH	++	++++	++++	+	+++
CAR	++++	+	++	++	+
HX	+++	+	++	++	+++
MET	++++	+	+	+++	+
AQ	+++	+	++	+++	+

The histopathological examination was performed only to mice stomachs receiving saline (VEH) as negative control, 50 mg/kg of carbenoxolone (CAR) as positive control, 300 mg/kg of; HX, MET and AQ extracts, and non-treated mice (Normal). - none, + low, ++ moderate, +++ high, ++++ very high.

FRANCISCO PALACIOS-ESPINOSA, WENDY ESCOBEDO-HINOJOSA, IRMA ROMERO
PANORAMA ACTUAL DEL ESTUDIO DE LAS PLANTAS CON ACTIVIDAD ANTI-*Helicobacter pylori*
Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, vol. 14, núm. 1, junio, 2011, pp. 51-61,
Universidad Nacional Autónoma de México
México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43219047006>

**Tip Revista Especializada en
Ciencias Químico-Biológicas**

*Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-
Biológicas,*
ISSN (Versión impresa): 1405-888X
revistatip@yahoo.com
Universidad Nacional Autónoma de México
México

¿Cómo citar?

Fascículo completo

Más información del artículo

Página de la revista

www.redalyc.org

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

PANORAMA ACTUAL DEL ESTUDIO DE LAS PLANTAS CON ACTIVIDAD ANTI-*Helicobacter pylori*

FRANCISCO PALACIOS-ESPINOSA,

WENDY ESCOBEDO-HINOJOSA E IRMA ROMERO

Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

Av. Universidad No. 3000, Col. Universidad Nacional Autónoma de México, C.U.

Delegación Coyoacán, México D.F. 04510, México D.F. E-mail: irma@bq.unam.mx

RESUMEN

La bacteria *Helicobacter pylori* es reconocida como el principal agente causal de la gastritis crónica activa, de la úlcera péptica, así como un factor de predisposición del carcinoma gástrico. Se estima que más del 50% de la población mundial está infectada por esta bacteria y, en el caso de México, se reporta una seroprevalencia del 66%. La terapia empleada para la erradicación de la bacteria falla en más del 20%, principalmente por la generación de resistencia a los antibióticos comerciales. De tal manera, es importante controlar estas enfermedades, buscando nuevos tratamientos y/o compuestos que sean más específicos, menos tóxicos y de fácil acceso a la población.

Los productos naturales vegetales constituyen potenciales fuentes para el descubrimiento y desarrollo de nuevos agentes efectivos contra la infección de esta bacteria. En este trabajo se presenta la perspectiva actual a nivel mundial, acerca de las investigaciones que se están llevando a cabo en este campo. Se tratan temas como la evaluación preliminar de extractos de una cantidad considerable de plantas, el aislamiento de compuestos puros a partir de los extractos bioactivos, la elucidación del probable mecanismo de acción, estudios integrales que evalúan propiedades antiinflamatorias y gastroprotectoras y, por último, la modificación química de compuestos prototipo.

Palabras Clave: Antibacteriano, gastritis, *Helicobacter pylori*, plantas medicinales, productos naturales.

ABSTRACT

Helicobacter pylori is recognized as the major etiological agent of chronic active gastritis, peptic ulcer, as well as a predisposing factor in gastric carcinoma. It is estimated that over 50% of the population is infected by this bacterium and, in the case of Mexico, a 66% seroprevalence is reported. The current eradication treatment fails in more than 20% of cases, mainly due to resistance generated to commercial antibiotics. Thus, in order to control these diseases, it is important to find new treatments and/or compounds, more specific, less toxic, and easily accessible to the population.

Plant natural products are potential sources for the discovery and development of new anti-*H. pylori* agents. This paper presents the state of the art on world research in this regard. It covers topics such as preliminary evaluation of plant extracts (screenings), the isolation of pure compounds from bioactive extracts, the elucidation of the probable mechanism of action, comprehensive studies evaluating anti-inflammatory and gastroprotective properties, and finally, chemical modification of prototype compounds.

Key Words: Antibacterial, gastritis, *Helicobacter pylori*, medicinal plants, natural products.

INTRODUCCIÓN

Un descubrimiento que cimbró el ambiente científico de la medicina, la bacteriología y sobre todo de la gastroenterología fue la demostración de que en la mucosa del estómago viven bacterias que colonizan y lesionan al epitelio. Los médicos australianos Barry Marshall y Robin Warren fueron los responsables, en 1982, de identificar y cultivar una bacteria microaerófila presente en el estómago humano capaz de tolerar condiciones de pH de 2 o menos y cuya colonización y desarrollo en la mucosa gástrica, representa un factor etiopatogénico indiscutible para ocasionar gastritis, úlceras pépticas, linfoma tipo MALT e incluso ser un factor de predisposición para cáncer gástrico¹. Esta bacteria fue clasificada en 1989 como *Helicobacter pylori*².

El hallazgo mencionado, no fue aceptado fácilmente por el ambiente científico del momento, ya que, desde principios del siglo XIX, se asoció al desarrollo de la enfermedad ulcerosa péptica, factores etiológicos primarios como hipersecreción ácida y estrés (dando forma a teorías psicósomáticas) y factores secundarios como el alcohol, tabaquismo, medicamentos, alimentos irritantes, e incluso se habló por años de predisposición familiar ulcerogénica, pero nunca se había pensado en una etiología bacteriana³.

Pero los científicos australianos, no sólo dieron un papel protagónico a la bacteria, sino que también se lo dieron a la mucosa gástrica en relación a sus funciones secretoras, hormonales y nerviosas.

El establecimiento del papel de *H. pylori* fue uno de los fenómenos más importantes en las investigaciones biomédicas de los últimos años, ya que significó que esta bacteria ocupara un lugar protagónico en el interés de diversos campos de estudio: clínico, bacteriológico, epidemiológico, farmacológico, inmunológico, genético, etc., tal como lo demuestra el hecho de que al solicitar en un servidor de internet información sobre la bacteria, la respuesta sea de miles de publicaciones en los últimos 28 años, e incluso que tenga el privilegio de contar con una publicación exclusiva (*Helicobacter* <http://www.wiley.com/bw/journal.asp?ref=1083-4389>).

Actualmente se conoce que *H. pylori* es la responsable de la infección bacteriana crónica gastrointestinal más común en el mundo, estimándose que la prevalencia mundial está por arriba del 50%, y a pesar de esto, no se le ha podido considerar como parte de la microbiota habitual por el hecho de que su presencia siempre produce en los infectados una respuesta inflamatoria en grado variable, lo que representa un verdadero problema de salud.

CARACTERÍSTICAS DE *H. pylori*

H. pylori es una bacteria Gram-negativa, de forma curva, espiral o fusiforme, mide de 2 a 4 µm de longitud y 0.5 a 1 µm de

ancho (Figura 1). Presenta de 4 a 6 flagelos unipolares de 3 µm de longitud aproximadamente; estos flagelos confieren motilidad y permiten el movimiento rápido en soluciones viscosas como la capa del moco que cubre las células epiteliales gástricas facilitando así la colonización en el estómago⁴.

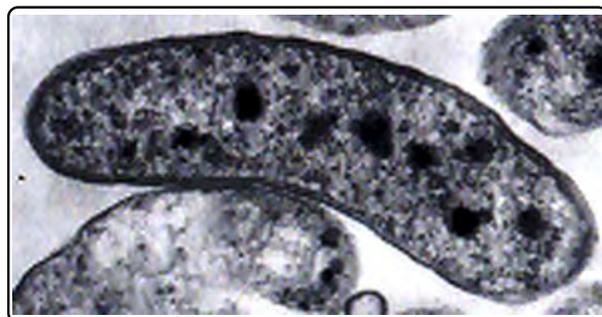


Figura 1. Micrografía electrónica de *Helicobacter pylori*.

En cultivos “viejos” o en condiciones desfavorables, *H. pylori* asume una forma cocoide, existe controversia sobre si estas formas son viables o no y se plantea que puede ser un mecanismo de resistencia, así como de transmisión de la bacteria⁴. *H. pylori* requiere de medios artificiales ricos en nutrientes como peptona, triptona, extracto de levadura, glucosa, suplementados con sangre y suero fetal bovino, es de crecimiento lento, necesitando una atmósfera microaerófila con concentraciones de O₂ de 2 a 8% y de CO₂ de 7 a 10%.

Factores de virulencia de *H. pylori*

H. pylori se ha especializado para vivir y persistir en un ambiente hostil como lo es el estómago humano, para lograr esto posee una serie de factores y mecanismos que le han permitido adaptarse exitosamente a él, los cuales se pueden clasificar en tres tipos: a) factores de colonización gástrica, b) factores involucrados en la inflamación y daño al tejido gástrico y c) factores de sobrevivencia⁵.

a) **Factores de colonización gástrica.** Para evadir el ambiente ácido del estómago, *H. pylori* produce una potente ureasa que hidroliza a la urea en CO₂ y amonio, neutralizando el ambiente alrededor de ella durante su colonización en el estómago. Esta actividad enzimática está altamente conservada en todas las cepas de *H. pylori*, lo que ha permitido usarla como diagnóstico. De cualquier manera la bacteria trata de minimizar el tiempo de exposición al medio ácido del lumen estomacal; gracias a la motilidad que le brindan sus flagelos, nada a través del viscoso mucus hasta alcanzar el ambiente casi neutro cercano al epitelio gástrico que es rico en nutrientes⁶. Esta propiedad también le permite a la bacteria resistir las contracciones musculares que regularmente vacían al estómago y que provocarían su salida. La mayor parte de la población de bacterias que se encuentra en el estómago está en la capa de moco y un 20% está asociada a

las células epiteliales⁶. La adhesión de *H. pylori* a la célula epitelial es un prerrequisito para iniciar los procesos de virulencia, se han descrito varias adhesinas en la membrana externa de la bacteria que interactúan con estructuras complementarias en las células del epitelio gástrico del humano, como pueden ser glicoproteínas y glicolípidos.

b) Factores involucrados en la inflamación y daño al tejido gástrico. Dentro de estos factores tenemos enzimas como la fosfolipasa A y la alcohol deshidrogenasa; así mismo, el lipopolisacárido (LPS) juega un papel importante en la inducción de una respuesta inmune, vía CD4 leucocitaria. También, se han encontrado proteínas proinflamatorias, las cuales están asociadas a la superficie y activan células inflamatorias, incluyendo macrófagos y neutrófilos⁷.

Otro factor de virulencia es la citotoxina vacuolizante (Vac A), que produce vacuolización en las células epiteliales conduciendo a la destrucción de la mucosa. Es codificada por el gen *vacA*, que está presente en todas las cepas de *H. pylori*, sin embargo, la estructura de los alelos del gen varía particularmente en dos regiones: la señal, que puede ser del tipo s1 o s2 y la media que puede ser del tipo m1 o m2. Las cepas con la combinación s1m1 han sido asociadas con mayor virulencia, aunque existen excepciones⁸.

Uno de los factores principales de daño al tejido es la isla de patogenicidad Cag-PAI, que 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*⁺. El Sistema de Secreción tipo IV (SST4), un conjunto de proteínas codificadas por Cag-PAI es la estructura encargada de internalizar los productos bacterianos a las células epiteliales gástricas del hospedero. La proteína CagA, es sin duda una de las más importantes de la isla, induce la producción de interleucina 8 y del factor de necrosis tumoral, con la consecuente estimulación de la respuesta inflamatoria. CagA es trasladada por el SST4 a las células epiteliales infectadas donde es fosforilada, reconocida y unida a un complejo de tirosinafosfatasa que induce defosforilación en diversas proteínas de la célula y efectos múltiples como cambios en el citoesqueleto, en la motilidad y apoptosis⁸.

Las cepas *cagA*⁺ son más virulentas que las *cagA*⁻ y juegan un papel preponderante en el desarrollo de gastritis atrófica, úlcera péptica y cáncer gástrico. La presencia de *vacA* y *cagA*⁺ en una cepa ha mostrado ser la combinación más patogénica⁸.

c) Factores de sobrevivencia. La bacteria posee enzimas como la superóxido dismutasa y la catalasa que previenen la fagocitosis producto de la respuesta inmunitaria del hospedero. Por otra parte, las formas cocoides, aunque se discute acerca de su viabilidad, podrían ser una forma de resistencia para la bacteria en condiciones desfavorables.

EPIDEMIOLOGÍA

Se estima que más del 50% de la población mundial está infectada por la bacteria, sin embargo, la prevalencia de la infección depende de factores socioeconómicos y de la infraestructura sanitaria, calculándose que en países desarrollados es de 10 al 40% y esta cifra se incrementa hasta un 80 ó 90% en países en vías de desarrollo^{9,10}. En el caso de México, Torres y col. en 1998 reportan una seroprevalencia del 66% y que la infección se adquiere a edades tempranas, alcanzando un 80% en adultos jóvenes entre 18 y 20 años de edad, con una tasa de incremento del 5% anual durante los primeros 10 años de vida¹¹.

La adquisición natural de la infección por *H. pylori* ocurre principalmente dentro del núcleo familiar y es la madre quien infecta al hijo en los primeros años de vida, aunque también se puede dar por el contacto con otras personas. La ingestión parece ser el medio más probable de adquirir a la bacteria y puede alcanzar la cavidad bucal vía: gastro-oral, fecal-oral u oral-oral¹².

ENFERMEDADES ASOCIADAS A *H. pylori*

Una vez que la bacteria coloniza la mucosa gástrica permanece por años e incluso por décadas, en la mayoría de los casos, con mínima sintomatología para el paciente.

La gastritis es el daño básico que media la infección por *H. pylori*, la cual está asociada a mecanismos inmunes, humorales y celulares, provocando la inflamación de la mucosa gástrica. Recientemente, se han agrupado las diferentes patologías en tres fenotipos gástricos principales⁶. El primer fenotipo, y el más común, es “la gastritis simple”, caracterizada por una pangastritis suave con secreción ácida normal, aunque con una concentración alta de gastrina en suero. Este fenotipo es común en sujetos asintomáticos y en aquéllos que no desarrollan una enfermedad gastrointestinal seria. El segundo fenotipo es la “úlcera péptica”, presente en alrededor del 15% de los pacientes infectados. Se caracteriza por gastritis antral, gastrina elevada y secreción ácida con problemas en su regulación. La combinación de estas anomalías contribuye al desarrollo de las úlceras pépticas (gástricas y duodenales). Se ha asociado a *H. pylori* con el 95% de las úlceras duodenales y con el 85% de las gástricas. El tercero y más grave de los fenotipos es el “cáncer gástrico”, afecta aproximadamente del 1 al 2% de los sujetos infectados y está caracterizado por un patrón de gastritis crónica predominantemente del corpus, gastritis atrófica multifocal y tanto hipo, como aclorhidria. Se presentan niveles altos de gastrina y una baja relación de pepsinógeno I/II. El adenocarcinoma se desarrolla de una secuencia de lesiones que incluyen la inflamación crónica no atrófica, gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal, displasia y carcinoma. Se ha observado que los sujetos que desarrollan úlceras pépticas no llegan a presentar cáncer gástrico, lo que indica caminos divergentes en estas patologías^{6,13}.

El cáncer gástrico ocupa a nivel mundial el segundo lugar dentro de la mortalidad por cánceres (www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html) de ahí, que la asociación entre cáncer gástrico y *H. pylori* provocara gran interés cuando la Organización Mundial de la Salud, clasificó a esta bacteria como un carcinógeno tipo I⁴. De acuerdo al último reporte de la Secretaría de Salud, del 2005, el cáncer gástrico se encuentra entre las 20 principales causas generales de mortalidad en México (dgis.salud.gob.mx).

El riesgo de desarrollar alguna de las patologías mencionadas dependerá de tres factores principalmente: a) la virulencia de la cepa o cepas de *H. pylori* que están infectando, b) la susceptibilidad genética del hospedero, incluyendo el tipo y grado de su respuesta inmunitaria a la infección y c) factores moduladores ambientales, como hábitos dietéticos, fumar, etc.⁸

TRATAMIENTO

La infección por *H. pylori* debe ser tratada con antibióticos como cualquier otra infección bacteriana. Sin embargo, con ningún antibiótico administrado por sí solo, se ha logrado una tasa significativa de erradicación, por lo que es necesario emplear dos antibióticos a los que sea susceptible la bacteria y terapias coadyuvantes como las que incrementan el pH del estómago (ya que varios de los antibióticos no son activos a pH bajo) o agentes antiseoretos del ácido estomacal, principalmente los inhibidores de la bomba de protones (IBP)¹⁵.

El tratamiento de primera elección es la "triple terapia" que está integrada por un IBP y las siguientes combinaciones de antibióticos: 1) amoxicilina + claritromicina, 2) para áreas donde se tenga reportada la resistencia a claritromicina: amoxicilina + metronidazol y 3) en casos de alergia a penicilinas: metronidazol + claritromicina. El tiempo de administración puede variar pero generalmente abarca de 7 a 14 días. Para esta terapia se reportan fallas en la erradicación de *H. pylori* en más del 20%, principalmente debida a la resistencia de la bacteria frente a la claritromicina y/o metronidazol; no obstante, en la práctica clínica, este porcentaje va en aumento¹⁶. La segunda línea de tratamiento o "terapia cuádruple", dependerá de la combinación de antibióticos utilizada inicialmente, pero generalmente este régimen está compuesto por un IBP, los antibióticos tetraciclina y metronidazol y se adicionan sales de bismuto, el tiempo de administración se puede prolongar hasta 21 días¹⁶.

En aquellos pacientes en los que la infección por *H. pylori* persiste tras un segundo curso de tratamiento, deberán realizarse pruebas de susceptibilidad a la bacteria para elegir el antibiótico a emplearse en el tercer intento de erradicación¹⁷. Los candidatos alternativos para esta tercera línea son las quinolonas (levofloxacina, moxifloxacina), tetraciclina, rifabutina y furazolidona. Otra combinación que ha sido exitosa es amoxicilina y levofloxacina o rifabutina y elevadas dosis de IBP¹⁶. Sin embargo, la prescripción de la rifabutina presenta el inconveniente

de promover resistencia a micobacterias, además de que se han reportado casos de mielotoxicidad y toxicidad ocular¹⁷, por lo que las terapias que incluyen a este antibiótico sólo deberán emplearse tras múltiples fallos previos en la erradicación cuando se administraron los otros antibióticos¹⁸ y constituirán una cuarta línea de tratamiento.

Una terapia recientemente empleada es la denominada sucesiva, cuyo fundamento es la administración de elevadas dosis consecutivas de antibióticos; la más común involucra 2 g de amoxicilina e IBP por 5 días, seguido de una triple terapia. Esta terapia ha demostrado tener tasas de erradicación mayores del 90% en Italia¹⁹.

Finalmente, hay que enfatizar que la erradicación de *H. pylori* se recomienda únicamente en pacientes con padecimientos gastroduodenales como: úlcera péptica, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa, gastritis atrófica, pacientes con familiares en primer grado que tengan antecedentes de cáncer gástrico, pacientes con deficiencia de hierro (anemia) inexplicable y pacientes con púrpura trombocitopénica crónica idiopática¹⁷.

Problemas con las terapias

a) Resistencia de *H. pylori* frente a los antibióticos

La frecuente administración de antibióticos anti-*H. pylori* prescritos para otras terapias antiparasitarias o antibacterianas (no anti-*H. pylori*), aunado a la limitada gama de antibióticos a los que es susceptible la bacteria y a la falta de cumplimiento en las terapias, ha generado la aparición de resistencia a los mismos disminuyendo sustancialmente la eficacia del tratamiento.

La resistencia más común reportada para los antibióticos empleados en el tratamiento contra *H. pylori* se debe a mutaciones puntuales en el sitio blanco del fármaco²⁰. La resistencia emerge por presión de selección, eliminando rápidamente a las bacterias susceptibles y sólo sobreviven aquellas con la mutación que les confiere resistencia. También se han reportado resistencias farmacológicas donde las cepas son susceptibles a un antibiótico *in vitro*, pero resistentes *in vivo*¹⁹.

Las tasas de resistencia reportadas para amoxicilina y tetraciclinas son de alrededor del 5 y 4%, respectivamente¹⁹; mientras que para el metronidazol se reporta una resistencia promedio del 35%, siendo Japón el país con la menor resistencia (3%) y Kenia con la mayor (100%). Por otro lado, para claritromicina la resistencia puede ser tan baja como del 1% (Holanda) y tan elevada como del 48% (Turquía), con una media del 14%²¹. Como se aprecia, el problema en la práctica clínica radica en la resistencia a estos dos últimos antibióticos²². En México, Torres y col. reportaron una resistencia a metronidazol del 80% en 1997, Garza-González del 37.1% en el 2002 y Chihu y col., del 58% en el 2005²³. Para claritromicina se reportó una resistencia del 24%²³. En cuanto a las fluoroquinolonas, existe una tendencia creciente en la adquisición de resistencia en países como Portugal y Japón

5.3%²⁴ y 5.5%²⁵, respectivamente. Finalmente para rifampicinas, en Alemania se ha reportado un 1.4% de resistencia²⁶.

Actualmente, se recomienda que si la tasa de resistencia local a claritromicina sobrepasa el 20%, no debe emplearse este agente¹⁷. Otra observación importante respecto al metronidazol es que la resistencia a este antibiótico *in vitro* no siempre predispone a la falla del tratamiento²⁷. El uso de un esquema adecuado de erradicación de *H. pylori*, debería tener éxito en un porcentaje superior al 90%. De hecho, la Asociación Americana de Gastroenterología, recomienda utilizar en primera instancia solamente esquemas que hayan demostrado una eficacia por encima del 85%²⁸.

Los mecanismos de acción y de adquisición de la resistencia han sido descritos ampliamente y se resumen en la Tabla I.

b) Otros factores

La falta del cumplimiento adecuado de los tratamientos por parte del paciente, es un factor vital en las bajas tasas de erradicación de la bacteria. La causa de esto es la complejidad de la terapia, que involucra por lo menos 3 fármacos, administrados en repetidas dosis, durante un largo periodo de tiempo. Debido a lo anterior, se presentan efectos secundarios que, aunados a una falta de mejoría inmediata, desmotivan al paciente a continuar con la terapia. Dentro de los efectos secundarios más frecuentes se reportan la diarrea, en un 30% de los pacientes, y el mal sabor de boca¹⁹. Por otro lado, los efectos adversos más comunes son: náusea y vómito (5%), salpullido (2%), dolor de cabeza (4%), malestar o dolor abdominal (5%) y estomatitis (3%)²⁹.

Otro aspecto que no podemos pasar por alto, es la implicación económica que representa la terapia anti-*H. pylori*; por ejemplo, en México, el costo del tratamiento de primera línea oscila entre 560 y 1260 pesos, lo cual puede ser un gasto difícil de solventar, conduciendo a la evolución de la infección en padecimientos más severos como la úlcera péptica y el cáncer.

PRODUCTOS NATURALES CON POTENCIAL ANTI-*H. pylori*

Desde tiempos inmemoriales, la humanidad ha utilizado a las plantas para el tratamiento de enfermedades comunes y para procurar su salud. Hoy en día, los sistemas de medicina tradicional basados en el uso de especies vegetales gozan de un gran respeto, especialmente en países con economías emergentes donde la disponibilidad de los servicios médicos y la accesibilidad a los tratamientos alopáticos es limitada³⁰. La resistencia de los microorganismos a los antibióticos comerciales es uno de los retos más grandes que enfrentan los sistemas de salud pública del mundo, *H. pylori* no es la excepción, como ya se mencionó. En vista de la incompleta erradicación lograda por la terapia tradicional, aunada a los altos costos de estos medicamentos y los efectos secundarios provocados a los pacientes; se hace necesaria la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento de la infección³¹. Los productos naturales, específicamente los de origen vegetal, constituyen potenciales fuentes para el descubrimiento y desarrollo de nuevos agentes efectivos contra las infecciones que hoy en día resultan difíciles de tratar. Varios grupos de investigación alrededor del mundo han encontrado miles de compuestos que presentan efectos inhibitorios sobre todo tipo de microorganismos³⁰, incluyendo

Antibióticos	Tipo	Mecanismo de acción del antibiótico	Genes	Efecto de la mutación en el gen
Claritromicina	Bacteriostático	Inhibición de la síntesis de proteínas en ARN 23S	<i>rrn 23S</i>	Disminución en la afinidad del ribosoma al antibiótico
Amoxicilina	Bactericida	Inhibición de la síntesis de peptidoglicano por bloqueo de proteínas de unión a penicilina (PBP)	<i>pbp1</i> <i>hopB</i> <i>hopC</i>	Disminución en la afinidad del antibiótico a las PBP
Tetraciclina	Bacteriostático	Inhibición de la síntesis de proteínas en ARN 30S	<i>rrn 16S</i>	Disminución en la afinidad del ribosoma al antibiótico
Metronidazol	Bactericida	El antibiótico tiene que ser reducido por reductasas bacterianas para la producción de radicales libres que dañan estructuras y ADN	<i>rdxA</i> , <i>frxA</i>	Inhibición de enzimas reductoras del metronidazol
Rifampicinas	Bacteriostático	Inhibición de la ARN polimerasa dependiente de ADN (subunidad β)	<i>rpoB</i>	Disminución en la afinidad de la ARN polimerasa al antibiótico
Fluoroquinolonas	Bactericida	Inhibición de la ADN girasa (subunidad A)	<i>gyrA</i>	Disminución en la afinidad de la ADN girasa al antibiótico

Modificado de Vakil & Mégraud¹⁹.

Tabla I. Mecanismos de acción y genes involucrados en la resistencia de los antibióticos utilizados en la terapia de erradicación de *H. pylori*.

por supuesto a *H. pylori*. Dichos trabajos incluyen la evaluación de extractos íntegros de una cantidad considerable de especies medicinales, aislamiento de compuestos puros a partir de extractos bioactivos, la elucidación del probable mecanismo de acción, estudios integrales que incluyen la evaluación de propiedades antiinflamatorias y gastroprotectoras por su relación con *H. pylori* como agente causal de esos padecimientos y, por último, la modificación química de compuestos prototipo para obtener moléculas con mejores actividades anti-*H. pylori*.

En esta sección se revisarán y discutirán algunos ejemplos de estas líneas de investigación en la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas para el control y la erradicación de *H. pylori*.

Estudios preliminares de selección de especies

El primer paso para descubrir extractos y/o compuestos bioactivos, consiste en realizar pruebas a un gran número de especies para determinar su potencial antibacteriano³². Diversos grupos de investigación alrededor del mundo han iniciado este tipo de proyectos científicos basándose fundamentalmente en el criterio de selección etnomédico, en particular centrándose en sus sistemas de medicina tradicional³³⁻⁴⁰. Este tipo de estudios evalúan extractos crudos; generalmente se trata de preparaciones acuosas (infusión o decocción) y etanólicas, aunque algunas veces se utilizan disolventes más apolares.

Usualmente, los métodos que se utilizan para determinar la Concentración Mínima del extracto necesaria para inhibir el crecimiento (CMI) de *H. pylori* son variados, aunque tratan de seguir los lineamientos sugeridos por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI). Se emplean cepas de colección (ATCC) y/o cepas obtenidas de muestras clínicas de pacientes diagnosticados con la infección y se utilizan como control de referencia los antibióticos utilizados en la terapia de erradicación. En los últimos 6 años destacan las evaluaciones de especies originarias de Irán, Taiwán, China, Italia, Pakistán, Camerún³³⁻⁴⁰. En nuestro país, el cual goza de una amplia variedad de especies vegetales medicinales y de las cuales un importante porcentaje se utilizan para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales; no se habían realizado evaluaciones para la identificación de especies medicinales que pudieran constituir fuentes de nuevos agentes para el combate de la infección de *H. pylori*. El primer estudio, utilizando plantas de la medicina tradicional maya yucateca, fue realizado por Anki y col.⁴¹ Posteriormente, nuestro grupo de trabajo se ha avocado a la evaluación de más de 53 plantas medicinales mexicanas útiles en el tratamiento de padecimientos gastrointestinales. Los resultados obtenidos han permitido identificar varias especies con un alto potencial para inhibir el crecimiento de *H. pylori* y que actualmente están siendo estudiadas para establecer a los principios antibacterianos^{42,43}.

En esta primera estrategia, por lo general los resultados sólo indican la concentración con la que los extractos inhiben el

crecimiento de la bacteria *in vitro* y no dan detalle acerca de si son bactericidas o bacteriostáticos. La actividad de los extractos se reporta clasificándolos como activos, moderadamente activos, con baja actividad o sin actividad y normalmente sólo hay unos cuantos que son muy activos, mientras que la mayor parte de los estudiados resultan moderadamente eficientes en su acción.

Este primer tamizaje de extractos es muy importante, ya que sienta las bases para la realización de estudios fitoquímicos con la intención de identificar a los compuestos bioactivos.

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

A partir de los estudios fitoquímicos biodirigidos se han identificado muchos compuestos con una destacable actividad anti-*H. pylori in vitro*. Kawase y Motohashi⁴⁴, realizaron una revisión exhaustiva, hasta marzo de 2003, de compuestos aislados derivados de plantas; posteriormente, una actualización hasta el 2007 fue realizada en nuestro país por Castillo-Juárez y Romero⁴⁵.

Se ha reportado una gran variedad de compuestos con actividad anti-*H. pylori in vitro*, destacándose flavonoides, taninos, cumarinas, terpenos, quinolonas, alcaloides. Sin embargo, sólo a muy pocos de ellos se les ha demostrado que mantienen su actividad *in vivo*. Dentro de los compuestos que cumplen con este requisito se encuentran: las catequinas, en particular la epigallocatequina galata⁴⁶, el terpeno plaunotol⁴⁷, las quinolonas 1-metil-2-[(Z)-8-tridecenil]-4-(1H)-quinolona y el 1-metil-2-[(Z)-7-tridecenil]-4-(1H)-quinolona⁴⁸, el flavonoide kamferol y el alcaloide triptantrina⁴⁹ y el sulforofano⁵⁰ (Figura 2).

Estudios integrales

Antes del descubrimiento de *H. pylori* como el principal agente etiológico de la gastritis y la úlcera péptica, se creía que estas patologías se debían, entre otras cosas, al exceso de acidez provocado por el estrés, ingesta de alcohol, irritantes y algunos medicamentos, por lo que los estudios con plantas se enfocaban únicamente a determinar su potencial anti-ulceroso o antiinflamatorio utilizando modelos animales donde el daño era producido por métodos químicos o físicos.

Actualmente conocemos la estrecha relación entre estas enfermedades y la infección con *H. pylori*; por lo que el enfoque actual pretende complementar la información de las propiedades antiinflamatorias y/o gastroprotectoras de agentes derivados de plantas con la actividad antibiótica, tratando de llegar a una perspectiva integral de la problemática.

Este tipo de enfoque es relativamente reciente, destacándose los estudios realizados en Brasil⁵¹⁻⁵⁶, en los que evaluaron las actividades gastroprotectoras, cicatrizantes del tejido gástrico y anti-*H. pylori* de 7 especies medicinales muy apreciadas en ese

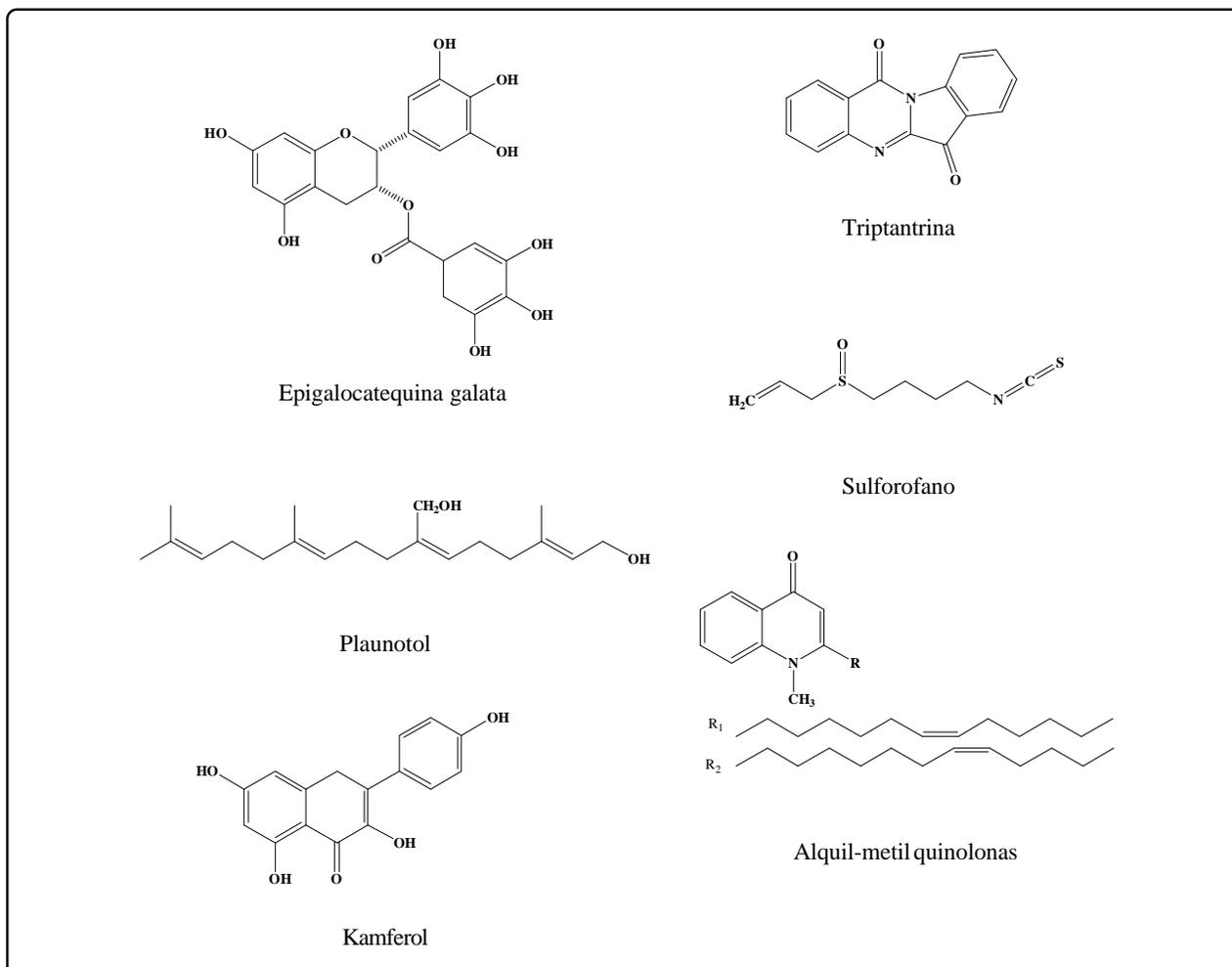


Figura 2. Compuestos selectos aislados de plantas medicinales con actividad anti-*H. pylori in vitro e in vivo*.

país. Las conclusiones de estos estudios indicaron que la eficacia terapéutica de esas especies se debe a la contribución de varios efectos farmacológicos. Por otra parte, un estudio sobre un compuesto aislado realizado en Corea del Sur, reporta la actividad antiinflamatoria de la mucosa gástrica y anti-*H. pylori* de la trifolirizina, aislada de la especie *Sophora flavescens*, empleada en el tratamiento de úlceras de las mucosas y la piel, diarrea e inflamación, entre otros padecimientos⁵⁷. Finalmente, cabe mencionar que en los estudios más completos se incluye la evaluación de toxicidad aguda y mutagenicidad, en función de establecer antecedentes sobre la inocuidad de las plantas para consumo humano^{51,52,54,56}.

Los estudios de gastroprotección y antiinflamatorios se pueden abordar con ensayos *in vivo* o *in vitro*. Dentro de los primeros, el modelo de gastroprotección más frecuente es el de úlcera aguda inducida por un agente injurante, principalmente por

etanol. En cuanto a las pruebas anti-inflamatorias, los modelos más comunes son aquéllos que producen la formación de un edema (por ejemplo, la administración de ésteres de forbol o carragenina). Estos modelos *in vivo* y sus posibles variaciones, nos permiten determinar un efecto general de los agentes derivados de la planta y una aproximación a su posible mecanismo de acción⁵⁸. Por otra parte, modelos *in vitro*, como la actividad antioxidante, inhibición de mediadores proinflamatorios o actividad antiquimiotáctica, nos dan información más precisa del mecanismo de acción.

Un punto que ha causado controversia es que el tipo de modelos biológicos empleados para determinar las actividades antiinflamatorias y/o gastroprotectoras, por lo general, no involucra la infección por la bacteria como la causa del daño gástrico o de la inflamación, sino a otros factores como agentes injuriantes o edematogénicos. Si bien, este tipo de modelos no

refleja las condiciones exactas de las patologías inducidas por *H. pylori*, permiten inferir a través de qué mecanismo actúan las plantas o los compuestos, para posteriormente realizar estudios más específicos o bien en un modelo animal de infección por *H. pylori*.

Modelos animales de infección por *H. pylori*. El desarrollo de modelos animales para la infección por *H. pylori* ha evolucionado mucho en los últimos años. Existen varios modelos en roedores, sin embargo, el implementado con gerbos (*Meriones unguiculatus*) es el más idóneo, ya que reproduce las patologías asociadas a la bacteria, como son la gastritis crónica activa, la metaplasia intestinal, las úlceras gástricas y duodenales, así como procesos cancerosos⁵⁹⁻⁶¹.

No obstante, el montaje del mismo no es fácil, de ahí que se sigan reportando los efectos de los agentes derivados de plantas bajo los modelos descritos en párrafos anteriores. Sin embargo, viene a ser un requisito indispensable si se quiere llegar a implementar algún agente derivado de plantas como terapia y/o si se quiere indagar más en el mecanismo de acción de dichos productos naturales.

Hay que hacer notar, que al igual que las terapias convencionales empleadas actualmente, ningún producto natural por sí solo ha logrado erradicar a la bacteria en este tipo de modelos, siendo necesarias terapias combinadas para lograr efectos significativos.

Mecanismo de acción

Si bien es importante aislar compuestos con actividad anti-*H. pylori* a partir de productos naturales, que puedan ser usados como nuevos fármacos para controlar la infección, el entender el mecanismo por el que actúan dichos compuestos es crucial para diseñar terapias más efectivas y evitar la generación de resistencias.

No obstante, aún no hay trabajos que analicen el mecanismo fino por el cual algún compuesto o producto derivado de plantas ejercen su acción, tal como los que se han hecho para los antibióticos comerciales. Los esfuerzos para lograr la elucidación se han centrado en estudiar su efecto sobre enzimas clave del metabolismo o sobre factores de virulencia de la bacteria.

Por ejemplo, Xiao y col. han descrito que los derivados polifenólicos del tipo de las isoflavonas inhiben la actividad ureasa de la bacteria⁶². Otros trabajos han demostrado el efecto inhibitorio de polifenoles procedentes de las brácteas del lúpulo, ricos en catequinas de alto peso molecular, sobre la toxina Vac A; se ha propuesto que el mecanismo de acción es a través de la formación de agregados con la toxina que previenen la interacción con su receptor y, por lo tanto, la internalización a la célula hospedera⁶³.

En otros casos, se ha estudiado el efecto de algunos compuestos

como las quinolonas sobre la síntesis del ADN bacteriano al actuar sobre la ADN girasa, la ADN topoisomerasa IV y sobre procesos básicos para la síntesis de energía como la cadena respiratoria^{48,64}.

También se han estudiado los efectos de compuestos como las catequinas, sobre procesos generales como el daño a la membrana y sobre la motilidad^{46,65}.

La adhesión bacteriana, mediada por interacciones carbohidrato-carbohidrato, es uno de los eventos cruciales para que la infección se lleve a cabo. Debido a esto, se ha especulado que moléculas o extractos ricos en compuestos poliméricos (taninos, antocianidinas y polifenoles de peso molecular alto), podrían constituir metabolitos idóneos para el desarrollo de nuevas terapias⁶⁶.

Ejemplos de estos estudios son los reportes del efecto inhibitorio del plaunotol⁶⁷, de fracciones de polisacáridos obtenidas del ginseng o de la *Artemisia capillaris*⁶⁸, y más recientemente del extracto (rico en ácidos urónicos y libre de catequinas) del té verde (*Camellia sinensis*)⁶⁹ y la fracción rica en polisacáridos de la sábila (*Aloe vera*)⁷⁰, sobre la adhesión de *H. pylori* a las líneas celulares gástricas (AGS y MKN85).

Tomando en cuenta el creciente desarrollo de resistencia a los antibióticos comerciales, el uso de compuestos que usen como blanco los factores de colonización, en particular los anti-adhesivos, son una perspectiva muy importante para la profilaxis de la infección, ya que al prevenir la invasión por la bacteria, se reducen los costos por tratamientos y se evita la generación de resistencias bacterianas.

Síntesis de productos con actividad anti-*H. pylori* a partir de compuestos prototipo

Otra estrategia para la obtención de nuevos compuestos con actividad contra la bacteria es la modificación química de moléculas líderes.

Una vez que se ha detectado que algún compuesto o familia de compuestos presentan excelente actividad anti-*H. pylori* y que su estructura tiene correlación con dicho efecto, surge el interés de la química medicinal en modificar a esa molécula, con la finalidad de mejorar sus propiedades antibacterianas, disminuir su toxicidad y/o mejorar sus propiedades farmacocinéticas.

Un estudio que ejemplifica esta estrategia es el trabajo de Chimenti y col., que describe la síntesis y evaluación *in vitro* de varios compuestos de tipo 2-oxo-2H-cromeno-3-carboxamida, tomando como esqueleto base o líder el de las cumarinas; un grupo de productos naturales de origen vegetal. Los resultados encontrados mostraron que la presencia de grupos funcionales acilo, éster o cloruro de acilo en la posición tres del grupo benzamida y un halógeno en la posición seis del anillo cumarina,

aumentaron la actividad anti-*H. pylori* en tres órdenes de magnitud⁷¹.

Por otro lado, la modificación estructural de un agente antibacteriano de la terapéutica clásica, por la adición de moléculas con ciertas propiedades farmacológicas, genera una nueva especie química que posee actividades diferentes o complementarias, como es el caso del estudio realizado por Zhu y col., donde se describe la adición de flavonoides a la molécula del metronidazol, con el objeto de generar derivados capaces de disminuir los problemas de resistencia y agregar propiedades antiinflamatorias, características atribuibles a este tipo de compuestos. El derivado con el que se obtuvieron los mejores resultados fue metronidazol-genisteína, el cual presentó una CMI 50 veces mejor a la del metronidazol y redujo los niveles de interleucina-8 en células AGS⁷².

CONCLUSIONES

Los productos naturales derivados de plantas son una fuente importante para la obtención de compuestos útiles en el tratamiento de la infección por *H. pylori* y/o las enfermedades asociadas a ésta. Dentro de las ventajas que ofrecen las plantas medicinales destaca su multifuncionalidad, lo que podría permitir, por un lado, que un solo preparado pueda ser utilizado para distintos padecimientos o que coadyuven, junto con otros fármacos ya conocidos, en el tratamiento de las enfermedades producidas por *H. pylori*. De igual forma, estas moléculas bioactivas pueden constituir la base estructural para el desarrollo de nuevos antibióticos más eficaces, menos costosos y con efectos secundarios menores que aquéllos provocados por los fármacos comerciales.

AGRADECIMIENTOS

A DGAPA-UNAM y a CONACyT que ha asignado recursos para nuestros proyectos de investigación (PAPIIT IN225711) y han dado becas al Dr. Juan Francisco Palacios y a la M. en B. Wendy Escobedo. Al Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM.

REFERENCIAS

- Marsall, B.J. & Warren, J.P. Unidentified curved bacilli in the stomach patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* **1**, 1311-1315 (1984).
- Goodwin, C.S. et al. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**, 397-405 (1989).
- Pajares, J.M. & Gisbert, J.P. *Helicobacter pylori*: its discovery and relevance for medicine. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* **98**, 770-785 (2006).
- O'Rourke, J. & Bode, G. Morphology and Ultrastructure. In: *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics. (eds. Mobley, H. L. T., Mendz, G. L. & Hazell, S. L.) 53-67 (ASM Press Washington, 2001).
- Ogura, K. et al. Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in mongolian gerbil. *J. Exp. Med.* **192**, 1601-1609 (2000).
- Amieva, M.R. & El-Omar, E.M. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterol.* **134**, 306-323 (2008).
- Falkow, S. Perspectives series: host/pathogen interactions. Invasion and intracellular sorting of bacteria: searching for bacterial genes expressed during host/pathogen interactions. *J. Clin. Invest.* **100**, 239-243 (1997).
- Atherton, J.C. The Pathogenesis of *Helicobacter pylori*-Induced Gastro-Duodenal Diseases. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **1**, 63-96 (2006).
- Pérez-Pérez, G.I., Rothenbacher, D. & Brenner, H. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* **9**, 1-6 (2004).
- Taylor, D. & Parsonnet, J. Epidemiology and natural history of *H. pylori* infections of the gastrointestinal tract. En: Blaser, M.J., Smith, P.F., Ravdin, J., Greenberg, H. & Guerrant, R.L. 551-564 (Raven Press, New York, 1995).
- Torres, J. et al. A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in México. *J. Infect. Dis.* **178**, 1089-1094 (1998).
- Mitchell, H.M. Epidemiology of Infection. In: *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics (eds. Mobley, H.L.T., Mendz, G.L. & Hazell, S.L.) 7-18 (ASM Press, Washington, 2001).
- Kusters, J.G., van Vliet, A.H. & Kuipers, E.J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 449-490 (2006).
- IARC (International Agency for Research on Cancer). Live flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working group on the evaluation of Carcinogenic Risks to Human, Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks. Hum.* **61**, 1-241 (1994).
- Mégraud, F. Strategies to treat patients with antibiotic resistant *Helicobacter pylori*. *Internat. J. of Antimicrob. Agents* **16**, 507-509 (2000).
- Wannmacher, L. Review of the evidence for *H. pylori* treatment regimens. In Technical report series. pp. 33. Report of 18th expert committee on the selection and use of essential medicines. (WHO, 2011).
- Malfertheiner, P. et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* **56**, 772-781 (2007).
- Gisbert, J.P. "Rescue" regimens after *Helicobacter pylori* treatment failure. *World J. Gastroenterol.* **14**, 5385-5402 (2008).
- Vakil, N. & Mégraud, F. Eradication Therapy for *Helicobacter pylori*. Reviews in basic and clinical Gastroenterology. *Gastroenterol.* **133**, 985-1001 (2007).
- Mégraud, F. *Helicobacter pylori* and antibiotic resistance. *Gut* **56**, 1502 (2007).
- Mégraud, F. & Corti, R. Resistencia bacteriana del *Helicobacter pylori* en el mundo en el año 2009. *Acta Gastroenterol. Latinoam.* **39**, 282-290 (2009).
- Horiki, N. et al. Annual change of primary resistance to clarithromycin among *Helicobacter pylori* isolates from 1996 through 2008 in Japan. *Helicobacter* **14**, 86-90 (2009).
- Chihu, L. et al. Antimicrobial resistance and characterization of *Helicobacter pylori* strains isolated from Mexican adults with clinical outcome. *J. Chemother.* **17**, 270-276 (2005).
- Lopes, A.I. et al. Antibiotic-resistant *Helicobacter pylori* strains in Portuguese children. *J. Pediatr. Infect. Dis.* **24**, 404-409 (2005).

25. Fujimura, S. *et al.* *In vitro* activity of fluoroquinolone and the *gyrA* gene mutation in *Helicobacter pylori* strains isolated from children. *J. Med. Microbiol.* **53**, 1019-1022 (2004).
26. Glocker, E., Bogdan, C. & Kist, M. Characterization of rifampicin resistant clinical *Helicobacter pylori* isolates from Germany. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**, 874-879 (2008).
27. Rautelin, H., Seppälä, K., Renkonen, O.V., Vainio, U. & Kosunen, T.U. Role of metronidazole resistance in therapy of *Helicobacter pylori* infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 163-166 (1992).
28. Graham, D.Y. *et al.* A report card to grade *Helicobacter pylori* therapy. *Helicobacter* **12**, 275-278 (2007).
29. Ford, A. *et al.* Eradication therapy for peptic ulcer disease in *Helicobacter pylori* positive patients (rev). Cochrane Database Syst. Rev. 2006:CD003840.
30. Shahid, M. *et al.* Plant natural products as a potential source for antibacterial agents: Recent trends. *Curr. Med. Chem.* **8**, 211-225 (2009).
31. O'Connor, A., Gisbert, J. & O'Morain, C. Treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* **14**, 46-51 (2009).
32. Ghisalberti, E.L. Detection and isolation of bioactive natural products. In: Bioactive natural products: Detection, isolation, and structural determination. (eds. Colegate, S.M. & Molyneux, R.J.) 11-76 (Taylor & Francis Group, New York, 2008).
33. Nariman, F., Eftekhari, F., Habibi, Z. & Falsafi, T. Anti-*Helicobacter pylori* activities of six Iranian plants. *Helicobacter* **9**, 146-151 (2004).
34. Li, Y., Xu, C., Zhang, Q., Liu, J.Y. & Tan, R.X. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* action of 30 Chinese herbal medicines used to treat ulcer disease. *J. Ethnopharmacol.* **98**, 329-333 (2005).
35. Wang, Y.C. & Huang, T.L. Screening of anti-*Helicobacter pylori* herbs deriving from Taiwanese folk medicinal plants. *FEMS Immunol. Med. Microb.* **43**, 295-300 (2005).
36. Nostro, A. *et al.* Antibacterial effect of plant extracts against *Helicobacter pylori*. *Phytother. Res.* **19**, 198-202 (2005).
37. Zaman, R., Akhtar, M.S. & Khan, M.S. *In vitro* antibacterial screening of *Anethum graveolens* L. Fruit, *Cichorium intybus* L. Leaf, *Plantago ovata* L. Seed Husk and *Polygonum viviparum* L. Root extracts against *Helicobacter pylori*. *Int. J. Pharmacol.* **2**, 674-677 (2006).
38. Ndip, R.N. *et al.* *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of extracts of selected medicinal plants from North West Cameroon. *J. Ethnopharmacol.* **114**, 452-457 (2007).
39. Zaidi, S.F. *et al.* Bactericidal activity of medicinal plants, employed for treatment of gastrointestinal ailments, against *Helicobacter pylori*. *J. Ethnopharmacol.* **121**, 286-291 (2009).
40. Atapor, M. *et al.* *In vitro* susceptibility of the Gram negative bacterium *Helicobacter pylori* extracts of Iranian medicinal plants. *Pharm. Biol.* **47**, 77-80 (2009).
41. Ankli, A. *et al.* Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. *J. Ethnopharmacol.* **79**, 43-52 (2002).
42. Castillo-Juárez, I., Rivero-Cruz, F., Celis, H. & Romero, I. Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. *J. Ethnopharmacol.* **114**, 72-77 (2007).
43. Castillo-Juárez, I. *et al.* Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *J. Ethnopharmacol.* **122**, 402-405 (2009).
44. Kawase, M. & Motohashi, N. Plant-derived leading compounds for eradication of *Helicobacter pylori*. *Curr. Med. Chem.* **3**, 89-100 (2004).
45. Castillo-Juárez, I. & Romero, I. Plantas con actividad anti-*H. pylori*: una revisión. *Bol. Soc. Bot. Mex.* **80**, 35-61 (2007).
46. Mabe, K., Yamada, M., Oguni, I. & Takahashi, T. *In vitro* and *in vivo* activities of tea catechins against *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1788-1791 (1999).
47. Koga, T. *et al.* Effect of plaunotol in combination with clarithromycin or amoxicillin on *Helicobacter pylori* *in vitro* and *in vivo*. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**, 133-136 (2002).
48. Tominaga, K. *et al.* *In vivo* action of novel alkyl methyl quinolone alkaloids against *Helicobacter pylori*. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**, 547-552 (2002).
49. Kataoka, M. *et al.* Antibacterial action of tryptanthrin and kaempferol, isolated from the indigo plant (*Polygonum tinctorium* Lour.), against *Helicobacter pylori*-infected mongolian gerbils. *J. Gastroenterol.* **36**, 5-9 (2001).
50. Haristoy, X., Angioi-Duprez, K., Duprez, A. & Lozniewski, A. Efficacy of sulforaphane in eradicating *Helicobacter pylori* in human gastric xenografts implanted in nude mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 3982-3984 (2003).
51. Lima, Z.P. *et al.* *Byrsonima fagifolia*: An integrative study to validate the gastroprotective, healing, antidiarrheal, antimicrobial and mutagenic action. *J. Ethnopharmacol.* **120**, 149-160 (2008).
52. Moraes, T.M. *et al.* *Hancornia speciosa*: indication of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions. *J. Ethnopharmacol.* **120**, 161-168 (2008).
53. Cruz, M. *et al.* *Mouriri elliptica*: Validation of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* effects. *J. Ethnopharmacol.* **123**, 359-368 (2009).
54. Kushima, H. *et al.*, *Davilla elliptica* and *Davilla nitida*: Gastroprotective, anti-inflammatory immunomodulatory and anti-*Helicobacter pylori* action. *J. Ethnopharmacol.* **123**, 430-438 (2009).
55. Quílez, A. *et al.* Anti-secretory, anti-inflammatory and anti-*Helicobacter pylori* activities of several isolated from *Piper carpubaya* Ruiz & Pav. *J. Ethnopharmacol.* **128**, 583-589 (2010).
56. Mazzolin, L.P. *et al.* *Qualea parvifolia* Mart: An integrative study to validate the gastroprotective, antidiarrheal, antihemorrhagic and mutagenic action. *J. Ethnopharmacol.* **127**, 508-514 (2010).
57. Kang, M.H. *et al.* Antigastric and anti-*Helicobacter pylori* of trifolirhizin from *Sophora radix*. *Korean J. Pharmacog.* **37**, 266-271 (2006).
58. Williamson, E., Okpako, D.T. & Evans, F.J. Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material (John Wiley and Sons, New York, 1996).
59. Watanabe, T., Tada, M., Nagai, H., Sasaki, S. & Masafumi, N. *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in mongolian gerbils. *Gastroenterol.* **115**, 642-648 (1998).
60. Ikeno, T. *et al.* *Helicobacter pylori*-induced chronic active gastritis, intestinal metaplasia, and gastric ulcer in mongolian gerbils. *Am. J. Pathol.* **154**, 951-960 (1999).
61. Nakagawa, S., Osaki, T., Fujioka, Y., Yamaguchi, H. & Kamiya, S. Long-term infection of Mongolian gerbils with *Helicobacter pylori* microbiological, histopathological, and serological analyses. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **12**, 47-53 (2005).
62. Xiao, Z.P. *et al.* Polyphenols based on isoflavones as inhibitors of *Helicobacter pylori* urease. *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 3703-3710 (2007).
63. Yahiro, K. *et al.* Inhibitory effects of polyphenols on gastric injury

- by *Helicobacter pylori* VacA toxin. *Helicobacter* **10**, 231-239 (2005).
64. Rho, T.C., Bae, E.A., Kim, D., Oh, W., Kim, B. & Lee, H. Anti-*Helicobacter pylori* activity of quinolone alkaloids from *Evodia fructus*. *Biolog. & Pharmaceut. Bulletin* **22**, 1141-1143 (1999).
65. Matsubara, S. et al. Suppression of *Helicobacter pylori*-induced gastritis by green tea extract in Mongolian gerbils. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **310**, 715-719 (2003).
66. Wittschier, N. et al. Large molecules as anti-adhesive compounds against pathogens. *J. Pharm. Pharmacol.* **59**, 777-786 (2007).
67. Takagi, A. et al. Plaunotol suppresses interleukin-8 secretion induced by *Helicobacter pylori*: therapeutic effect of plaunotol on *H. pylori* infection. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **15**, 374-380 (2000).
68. Lee, J.H., Park, E.K., Uhm C.S., Chung, M.S. & Kim, K.H. Inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric adenocarcinoma epithelial cells by acidic polysaccharides from *Artemisia capillaris* and *Panax ginseng*. *Planta Medica* **70**, 615-619 (2004).
69. Lee, J.H. et al. *In vivo* anti-adhesive activity of green tea extract against pathogen adhesion. *Phytother. Res.* **23**, 460-466 (2009).
70. Xu, C. et al. Anti-adhesive effect of an acidic polysaccharide from *Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.). Berger on the binding of *Helicobacter pylori* to the MKN-45 cell line. *J. Phar. Pharmacol.* **62**, 1753-1759 (2010).
71. Chimenti, F. et al. A novel class of selective anti-*Helicobacter pylori* agents 2-oxo-2H-chromene-3-carboxamide derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 6179-6185 (2008).
72. Zhu, H.L. et al. Metronidazole-Flavonoid derivatives as anti-*Helicobacter pylori* agents with potent inhibitory activity against HPE-Induced Interleukin-8 production by AGS cells. *Chem. Med. Chem.* **2**, 1361-1369 (2007).