



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO DEL POTENCIAL ANTI-*Helicobacter pylori* DE EXTRACTOS Y ALIMENTOS  
PREPARADOS A PARTIR DE TRES ESPECIES SUBVALORADAS Y SUBUTILIZADAS DE  
QUELITES**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**MARICRUZ MARTÍNEZ MARTÍNEZ**

**Director de Tesis**

**Dra. Irma Romero Álvarez**



**Ciudad Universitaria, CD.MX.**

**2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Rodolfo Pastelin Palacios

**VOCAL:** Profesor: Samuel Canizales Quinteros

**SECRETARIO:** Profesora: Irma Romero Álvarez

**1er. SUPLENTE:** Profesora: Laura Carmona Salazar

**2° SUPLENTE:** Profesora: María Amanda Gálvez Mariscal

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

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

**SUPERVISOR TÉCNICO: DRA. MARÍA AMANDA GÁLVEZ MARISCAL**

**SUSTENTANTE: MARICRUZ MARTÍNEZ MARTÍNEZ**

## **Agradecimientos**

Al proyecto CONACYT 214286: "Rescate de especies subvaloradas tradicionales de la dieta mexicana y su contribución para el mejoramiento de la nutrición en México" a cargo de la Dra. María Amanda Gálvez Mariscal, por su financiamiento y apoyo para la elaboración de este trabajo.

Al programa DGAPA-PAPIIT IN216414: "Estudio del mecanismo de acción de extractos y compuestos aislados de plantas medicinales sobre *H. pylori*" por apoyar parcialmente el desarrollo del trabajo.

A la Dra. Irma Romero Álvarez por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y guiar esta tesis con su apoyo y enseñanzas. Gracias por la paciencia, correcciones y consejos otorgados en este tiempo.

A la Mtra. Edelmira Linares y al Dr. Robert Bye del Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM por la ayuda en la coleta e identificación de la especie *Anoda cristata*.

A la Q.A. Fabiola Ayala Alcántara por su apoyo en la elaboración de las muestras utilizadas y su invaluable ayuda en la integración de este trabajo dentro del marco del proyecto CONACyT 214286.

A los integrantes del jurado: Dr. Rodolfo Pastelin Palacios, Dr. Samuel Canizales Quinteros y Dra. Laura Carmona Salazar por su tiempo, observaciones y evaluación a este trabajo.

A la Dra. Erika Gómez Chang por su asistencia técnica en el manejo de *H. pylori*.

A la Dra. Erika Rendón Huerta por las facilidades otorgadas para la utilización de la infraestructura para el manejo de la línea celular empleada.

# I. Índice

1.	Lista de abreviaturas.....	1
2.	Lista de tablas.....	2
3.	Lista de figuras.....	2
II.	Resumen .....	4
III.	Introducción .....	6
	<i>3.1 Las Especies Tradicionales Subvaloradas y Subutilizadas (ETSS).....</i>	<i>6</i>
	<i>3.2 Antecedentes del consumo e importancia de los quelites en la dieta tradicional mexicana .....</i>	<i>7</i>
	<i>3.3 Especies de quelites seleccionadas para su estudio .....</i>	<i>9</i>
	3.3.1 Alache ( <i>Anoda cristata</i> (L.) Schltld.) .....	9
	3.3.2 Chepil ( <i>Crotalaria longirostrata</i> ) .....	11
	3.3.3 Chaya ( <i>Cnidoscolus chayamansa</i> McVaugh) .....	12
	<i>3.4 Propiedades de plantas comestibles y de uso medicinal .....</i>	<i>14</i>
	<i>3.5 Acerca del descubrimiento y clasificación de Helicobacter pylori.....</i>	<i>17</i>
	<i>3.6 Morfología y generalidades microbiológicas .....</i>	<i>18</i>
	<i>3.7 Colonización y factores de virulencia .....</i>	<i>19</i>
	3.7.1 Factores de colonización.....	19
	3.7.2 Factores de virulencia. ....	21
	<i>3.8 Patologías asociadas a Helicobacter pylori .....</i>	<i>22</i>
	3.8.1 Gastritis. ....	22
	3.8.2 Úlceras pépticas. ....	23
	3.8.3 Cáncer gástrico. ....	23
	<i>3.9 Epidemiología .....</i>	<i>24</i>
	<i>3.10 Tratamiento. ....</i>	<i>24</i>

IV. Hipótesis .....	26
V. Objetivos .....	26
5.1 <i>Objetivo general</i> .....	26
5.2 <i>Objetivos específicos</i> .....	26
VI. Metodología .....	27
6.1 <i>Materiales y reactivos</i> .....	27
6.2 <i>Obtención del material vegetal.</i> .....	27
6.3 <i>Preparación de extractos.</i> .....	27
6.4 <i>Preparación de alimentos y muestras utilizadas</i> .....	28
6.4.1 <i>Alimento de alache.</i> .....	28
6.4.2 <i>Alimento de chepil.</i> .....	28
6.4.3 <i>Alimento de chaya.</i> .....	29
6.4.4 <i>Procesamiento de las muestras de alimento.</i> .....	29
6.5 <i>Cultivo e identificación de Helicobacter pylori.</i> .....	29
6.6 <i>Determinación de la actividad anti-H. pylori</i> .....	31
6.7 <i>Cultivo y manejo de células AGS</i> .....	33
6.7.1 <i>Propagación de la línea celular</i> .....	33
6.7.2 <i>Conservación de células mediante ultracongelación</i> .....	34
6.7.3 <i>Crecimiento de células para experimentos de adherencia</i> .....	34
6.8 <i>Determinación de la actividad de extractos sobre la adherencia de H. pylori a células AGS</i> .....	34
VII. Resultados y Discusión .....	37
7.1 <i>Clasificación de muestras de quelites</i> .....	37
7.2 <i>Rendimiento de los Extractos</i> .....	38
7.3 <i>Manejo de alimentos preparados a partir de tres especies de quelites seleccionadas.</i> .....	41

7.4 Evaluación del potencial anti- <i>Helicobacter pylori</i> . .....	42
7.5 Evaluación del efecto sobre la adherencia de <i>H. pylori</i> a células AGS ....	49
Flavonoides de interés presentes en el alache ( <i>Anoda cristata</i> ) .....	54
VIII. Conclusiones.....	59
IX. Perspectivas.....	61
X. Bibliografía.....	62

## 1. Lista de abreviaturas

A <sub>600</sub>	Absorbancia a 600 nm
AGS	Línea celular de adenocarcinoma gástrico humano
alim	Alimentos preparados a partir de las especies seleccionadas de quelites
AQ	Extractos acuosos
BabA	Adhesina de unión a antígenos de tipo sanguíneo
CagA	Proteína asociada al gen <i>cagA</i>
<i>cagPAI</i>	Isla de patogenicidad <i>cag</i>
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DM	Extractos de diclorometano-metanol
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
ETSS	Especies tradicionales subvaloradas y subutilizadas
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
LPS	Lipopolisacárido de <i>H. pylori</i>
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosa
MU	Mucílagos obtenidos a partir de extractos acuosos
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Buffer fosfato salino
rpm	Revoluciones por minuto
SabA	Adhesina de unión a ácido siálico
SFB	Suero fetal bovino
UFC	Unidades formadoras de colonias



## 2. Lista de tablas

Tabla 1	Clasificación de muestras de los quelites proporcionados
Tabla 2	Rendimiento de extractos <b>DM</b>
Tabla 3	Rendimiento de extractos <b>AQ</b>
Tabla 4	Rendimiento de <b>MU</b> obtenidos de dos especies de quelites
Tabla 5	Clasificación de la actividad inhibitoria de extractos de acuerdo a su CMI

## 3. Lista de figuras

Figura 1	Colecta de Alache ( <i>Crotalaria longirostrata</i> )
Figura 2	Colecta de Chepil ( <i>Crotalaria longirostrata</i> )
Figura 3	Hojas de Chaya ( <i>Cnidoscolus chayamansa</i> Mc Vaugh)
Figura 4	Barry James Marshall y John Robin Warren
Figura 5	Microscopia de <i>H. pylori</i> colonizando células epiteliales
Figura 6	Diagrama de colonización para <i>H. pylori</i>
Figura 7	Pruebas bioquímicas y tinción de Gram para identificación de <i>H. pylori</i>
Figura 8	Extractos <b>DM</b> y <b>AQ</b> obtenidos a partir de los quelites en estudio
Figura 9	Separación de mucílago con etanol
Figura 10	Efecto de extractos <b>DM</b> sobre el crecimiento de <i>H. pylori</i>
Figura 11	Efecto de extractos <b>AQ</b> sobre el crecimiento de <i>H. pylori</i>
Figura 12	Determinación de la CMI de antibióticos de referencia
Figura 13	Efecto del <b>MU</b> de dos especies de quelites sobre el crecimiento de <i>H. pylori</i>

- Figura 14 Insolubilidad de muestra de alimento de alache en ensayo de actividad anti-*H. pylori*
- Figura 15 Efecto de alimentos preparados a partir de quelites sobre el crecimiento de *H. pylori*
- Figura 16 Efecto de extractos **DM** sobre la adherencia de *H. pylori* a células AGS
- Figura 17 Efecto de extractos **AQ** sobre la adherencia de *H. pylori* a células AGS
- Figura 18 Efecto del **MU** de dos especies de quelites sobre la adherencia de *H. pylori* a células AGS
- Figura 19 Efecto de alimentos preparados a partir de quelites sobre la adherencia de *H. pylori* a células AGS
- Figura 20 Estructura de Acacetina y Diosmetina
- Figura 21 Efecto de acacetina y diosmetina sobre el crecimiento y adherencia de *H. pylori*
- Figura 22 Insolubilidad de acacetina en ensayo de actividad anti-*H. pylori*

## II. Resumen

En México se cuenta con una gran variedad de recursos naturales, en donde encontramos actualmente a las especies tradicionales subvaloradas y subutilizadas (ETSS), que son aquellas que cuentan con valor nutrimental importante, pero cuyo cultivo y uso se ha reducido notablemente. En un esfuerzo por rescatar estas especies, se ha buscado estudiarlas para generar conocimiento acerca de sus propiedades.

Trabajos previos indican que especies utilizadas en la alimentación tradicional tienen propiedades antibióticas contra la bacteria *Helicobacter pylori*, agente etiológico de gastritis crónica, úlcera y adenocarcinoma gástrico. En México la prevalencia de infecciones gástricas asociadas a *H. pylori* es del 66%, por lo cual es considerada un problema de salud nacional. Las terapias para erradicar a la bacteria consisten principalmente en antibióticos, pero se han buscado fuentes alternas que reemplacen con efectividad o complementen los tratamientos.

La importancia de este trabajo radica en caracterizar la posible actividad de algunas ETSS de nuestro país contra la bacteria *H. pylori*, de tal manera que se le puedan sumar propiedades que representen un beneficio en su consumo. Con esto se busca promover la reinserción de las ETSS en la dieta cotidiana de la población e incidir en el control de patologías como la gastritis.

En este trabajo se estudió la actividad contra *H. pylori* de extractos y alimentos de tres especies de quelites: alache (*Anoda cristata*), chepil (*Crotalaria longirostrata*) y chaya (*Cnidocolus chayamansa*). Específicamente, se evaluó la actividad anti-*H. pylori* mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de su crecimiento, por el método de dilución en cultivo líquido y la inhibición de la adherencia de la bacteria a células AGS mediante medición fluorimétrica.

A partir de las muestras de quelites proporcionadas, se obtuvieron extractos acuosos y de diclorometano-metanol. Los resultados muestran que los extractos

con mejor actividad anti-*H. pylori* son los de diclorometano-metanol de chaya (CMI=62.5 µg/ml). El mayor efecto inhibitorio de la adherencia de *H. pylori* a células AGS lo presentaron en general los extractos de diclorometano-metanol (40-50%), sin mostrar diferencias significativas entre ellos.

Se obtuvieron también mucílagos a partir de los extractos acuosos de alache y chepil y se estudiaron de manera independiente. Los resultados obtenidos para la prueba anti-*H. pylori* indicaron que los mucílagos no tienen actividad sobre el crecimiento de la bacteria, pero sí sobre la adherencia. El mucílago con la mayor actividad antiadherente fue el de alache con un  $28.13 \pm 2.54\%$  de inhibición de la adherencia.

En el caso de los alimentos, se utilizaron: un guisado de alache, un tamal de chepil y agua de chaya. Todos ellos fueron procesados para obtener una muestra pulverizada. Ninguno de los alimentos mostró efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la bacteria pero si presentaron efecto sobre la adherencia de *H. pylori* a células AGS, donde el mejor fue el alimento de chepil (20% de inhibición).

De manera adicional, se estudiaron también dos flavonoides que se han reportado para el alache: acacetina y diosmetina, con el fin de caracterizar su actividad contra *H. pylori*. Los resultados mostraron que con una concentración de 3.9 µg/ml, la acacetina presentó un  $86.70 \pm 5.05\%$  máximo de inhibición del crecimiento de la bacteria, mientras que la diosmetina inhibió como máximo un  $91.94 \pm 2.16\%$ . En el caso de la prueba de adherencia, la acacetina presenta una mayor actividad anti-adherente respecto a la diosmetina, con un  $40.56 \pm 3.16\%$  de inhibición de la adherencia a una concentración final de 250 µg/ml.

Con los resultados obtenidos en este trabajo, podemos concluir que las tres especies estudiadas y sus alimentos tienen el potencial para ser revaloradas y que al ser consumidos de manera tradicional en una dieta variada, ayuden a incidir sobre el control de enfermedades ocasionadas por *H. pylori*.

### **III. Introducción**

El clima y geografía de México hacen posible que el país cuente con una gran diversidad en recursos alimenticios de origen vegetal (Arellano *et al*, 1984). Es por ello que México se reconoce como uno de los puntos de domesticación de plantas más importante del mundo.

La milpa o campo cultivado, ha sido parte fundamental de la historia alimentaria del país. Es ahí donde se conserva la biodiversidad agrícola y se producen una gran variedad de vegetales que se han mantenido en la dieta tradicional mexicana desde antes de la conquista.

Una característica general de la milpa, es su grado de diversidad de especies en forma de policultivos (Altieri y Nicholls, 2010), esto promueve una dieta diversa y la implantación de la llamada “triada mesoamericana”, cultivo de maíz, frijol y calabaza. Sin embargo, la milpa tradicional no se agota ahí, una amplia variedad de especies encuentran lugar al interior de dicho sistema; se trata de plantas comestibles o de uso medicinal que las poblaciones han usado desde épocas prehispánicas y cuyo conocimiento forma parte de su vida cotidiana. (Lazcarro, 2013; Linares y Bye, 2015).

#### *3.1 Las Especies Tradicionales Subvaloradas y Subutilizadas (ETSS)*

La mayoría de las plantas comestibles nativas de México actualmente son subvaloradas, pues a pesar de ser productos frescos y con grandes aportes nutrimentales, han caído en desuso.

Esto se debe en gran parte al cambio en la dieta promedio mexicana, donde se ha substituido la gran variedad de productos tradicionales por proteína animal y alimentos altamente industrializados con altos contenidos calórico (Gálvez y Bourges, 2012). A medida que estos alimentos industrializados han ganado popularidad, los productos alimenticios tradicionales, están perdiendo relevancia y competitividad.

Así es como ha surgido el término de Especies Tradicionales Subvaloradas y subutilizadas (ETSS) que se refiere a aquellas variedades de cultivos comestibles de uso tradicional que han perdido valor económico por su poca demanda y disminución consecuente de su abasto. Las milpas en las que crecen las ETSS de manera natural, se consideran poco productivas y de uso familiar.

De acuerdo con Padulosi y Hoeschle-Zeledon (2004) las ETSS presentan características como ser importantes para el consumo local y los sistemas de producción, ser altamente adaptables a sistemas agrícolas trabajados por el hombre y áreas marginadas, ser cultivadas y utilizadas con base en el conocimiento local y no incluirse en las agendas de políticas públicas además de ser exclusivas de agendas científicas. Asimismo, las ETSS son fuertemente dependientes de factores culturales y al mismo tiempo, debilitadas por sistemas de mercado y demandas más globalizadas.

Recientemente se ha prestado mayor importancia a las ETSS gracias a la búsqueda de nuevas fuentes de nutrientes al alcance de la población. Se busca también rescatar la biodiversidad y riqueza vegetal de las comunidades, así como generar mayor conocimiento acerca de las propiedades de estas especies.

### *3.2 Antecedentes del consumo e importancia de los quelites en la dieta tradicional mexicana*

Los quelites han sido parte de la dieta tradicional mexicana desde la época prehispánica. Su nombre deriva del náhuatl *quilitl*, que quiere decir hierba comestible, aunque actualmente el término incluye hojas, tallos e incluso flores. Los quelites son plantas herbáceas generalmente no cultivadas cuyas hojas jóvenes y partes tiernas se consumen inmaduras y ligeramente cocinadas (Bye, 1981).

En México existen al menos 358 especies de quelites comestibles en diversas regiones del país (Bye y Linares, 2000) donde la mayoría pertenecen a 6 familias: Asteraceae, Apiaceae, Fabaceae, Amaranthaceae, Chenopodiaceae y Brassicaceae. Este número puede modificarse de acuerdo con los usos y

nombres asociados a estas especies a lo largo de todo el territorio nacional. Algunas de las especies de quelites más conocidas y estudiadas son el pápalo quelite, la verdolaga, el huauzontle, el berro, el romero y la chaya.

La mayoría de estos quelites son colectados para autoconsumo de familias rurales aunque también se les encuentra en mercados locales en sus regiones de origen. Se ha demostrado que en la región de la sierra norte de Puebla, las comunidades consumen alrededor de 20 especies de quelites en su dieta (Caballero, 1984), demostrando así su importancia y gran distribución.

Los quelites también son fuente importante de micronutrientes, fibra y fitoquímicos importantes en la nutrición humana, lo que además de su bajo costo los mantiene como uno de los alimentos tradicionales más importantes (Gálvez y Bourges, 2012).

La composición nutrimental de los quelites, de manera general incluye más del 75% de agua, hidratos de carbono, fibras y pequeñas cantidades de lípidos. Varios quelites autóctonos, como la chaya, el chepil y los romeritos contienen incluso un 6% de proteína, valor alto comparado con el de vegetales cultivados más comunes (Yildirim *et al.*, 2001). Entre los micronutrientes presentes en estas especies destacan la vitamina A y C, calcio, potasio, y fósforo. (Morales de León *et al.*, 2013).

Según los expertos, una dieta debe ser balanceada y debe incluir al menos cinco porciones de vegetales al día. De acuerdo con su contenido de nutrientes, los quelites son una excelente alternativa para ser incluidos en la alimentación diaria, costumbre que se ha dejado de lado en la mayoría de la población urbana.

De acuerdo con Bourges y Vargas (2015), los quelites además de ser un excelente alimento, presentan otros usos: medicamentos, forraje, plantas de ornato y en la recuperación de suelos, pues los enriquecen y sus raíces profundas no compiten con otras plantas para su desarrollo.

Hasta la fecha, no se cuenta con un inventario nacional de las especies consideradas quelites y que se desarrollan en las milpas, lo que habla del poco conocimiento científico y el bajo interés socio-económico que los colocan como ETSS.

### *3.3 Especies de quelites seleccionadas para su estudio*

La presente tesis está incluida en el marco del proyecto CONACyT 214286: "Rescate de especies subvaloradas tradicionales de la dieta mexicana y su contribución para el mejoramiento de la nutrición en México". Para fines prácticos y de acuerdo con los objetivos de dicho proyecto, se eligieron tres especies de quelites representativas que tuvieran las siguientes características:

- Ser usadas de manera tradicional como alimento en poblaciones definidas.
- Formar parte de una cadena de valor en sus poblaciones de origen y aledañas.
- De ser posible, haber sido estudiada con anterioridad para contar con líneas de investigación confiables y ampliar conocimiento al respecto.

Las especies seleccionadas se presentan a continuación con su descripción botánica, distribución y usos más frecuentes.

#### *3.3.1 Alache (*Anoda cristata* (L.) Schltdl.)*

El alache es una planta nativa de México y Centroamérica que pertenece a la familia de las Malváceas. Es una hierba que crece postrada o erecta y alcanza de 30 a 50 cm de altura, los tallos presentan vellosidades y las hojas son triangulares. Sus flores son pequeñas y moradas (Fig. 1). Puede ser común en cultivos de maíz o algodón. Comienza a crecer a mediados de primavera pero florece a partir de verano a la par de la época de lluvias.

Otros nombres comunes: Flor decampante, genciana, hierba mora, malva, malvavisco, malvón de campo, malvón de quesitos, requesón, violeta de campo, violeta de monte; Guerrero: y'xuié tio (mixteco), alache; Oaxaca: guiea lo-



gubich; Puebla: tlachpahuatla (nahua), xicuni pogtoi (otomí); Veracruz: alanche; San Luis Potosí: muu ts'ojó/ (tenek) (Argueta, 1994).

Sinonimia: De acuerdo a The Plant List (2013) tenemos

*Anoda cristata* var. *albiflora* Heuchr.

*Anoda cristata* var. *brachyantha* (Rchb.) Hochr.

*Anoda cristata* var. *cristata*

*Anoda cristata* var. *digitata* (A.Gray) Heuchr.

Distribución: En México es generalizada, ya que se encuentra en la mayoría de los estados, destacando su uso en el Distrito Federal, Hidalgo, Estado de México, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tlaxcala y Veracruz (Villaseñor y Espinosa-García, 1998).

Usos: Las hojas y tallos en estadios tempranos se emplean como alimento y es una especie reconocida como quelite. De acuerdo con Linares y Aguirre (1992), una de las maneras más comunes de prepararlos es al vapor sazonándolos con especias como sal, ajo y cebolla y dejándolos cocinando en su jugo.

Esta planta también tiene un uso medicinal, los tallos, flores y hojas se usan para tratar la tos, según lo reportado en comunidades de los valles centrales de Oaxaca (Bautista-Cruz *et al.*, 2011) Utilizando la planta entera y sus flores en cocción se prepara un té para tratar inflamación en el estómago, fiebre y tos, también se usa como tratamiento para evitar la caída del pelo, entre otras molestias. Este uso tradicional se reporta principalmente en la región central de México, en los Estados de México, Puebla y Guerrero (Rendón *et al.*, 2001).

En un estudio farmacológico reciente, se ha demostrado la eficacia pre-clínica de extractos y compuestos puros obtenidos del alache, como agentes antihiperlipemiantes. También se determinó que el extracto acuoso de la planta y dos compuestos aislados a partir de éste (acacetina y diosmetina), tienen un efecto antioxidante sobre radicales ROO• (Juárez-Reyes, *et al.*, 2015).



**Figura 1.** Colecta de partes aéreas de alache (Foto: Proyecto CONACyT No. 214286).

### 3.3.2 Chepil (*Crotalaria longirostrata*)

El chepil es una planta perenne originaria de México y Centroamérica perteneciente a la familia de las Fabáceas. Son arbustos de tallos lisos que alcanzan un tamaño de hasta 2 m de alto. Tiene hojas pequeñas, amarillas y aromáticas (Fig. 2).

Otros nombres comunes: Chipil, Chipilín, Tronador, Garbancillo, Chipilón. (Argueta, 1994)

Sinonimia: *Crotalaria longirostrata* var. *macrophylla* (Trópicos.org)

Distribución: Es una planta que crece en las milpas de climas tropicales. En México se puede encontrar en la región sur del país (Oaxaca, Chiapas, Campeche) y en países como Guatemala y El Salvador.

Usos: Las hojas y parte del tallo del chepil son ampliamente usadas como alimento, preparado principalmente en tamales, caldos y sopas. Se sabe que es rico en vitaminas y minerales como calcio, hierro, riboflavina, tiamina y niacina. (Morton, 1994). Jiménez-Aguilar y Grusak (2015) determinaron que el chepil también aporta cantidades importantes de minerales como potasio, magnesio y fosforo.

De manera popular el cocimiento de sus hojas se usa como tratamiento para el insomnio y reumatismo y para la curación de heridas en corto tiempo, se

emplea como cataplasmas y emplastos por vía tópica. Sin embargo, su uso medicinal tradicional se ha perdido recientemente, pues en un cuestionario aplicado a personas que consumen y comercializan el chepil en los valles centrales de la región de Oaxaca, no mencionaron ningún uso medicinal. (Comunicación personal, Taller: "Chepiles y otros quelites de los Valles Centrales de Oaxaca". 2015)

Químicamente el chepil posee cantidades importantes de alcaloides tanto en sus hojas, como en los tallos (Pilbeam, *et al.*, 1979) y presenta actividad antioxidante alta en comparación con otras especies tradicionales subvaloradas usadas en la alimentación (Jiménez-Aguilar y Grusak, 2015).



**Figura 2.** Colecta de chepil cultivado y chepil silvestre (Foto: Proyecto CONACyT No. 214286, Magali Cortés)

### 3.3.3 Chaya (*Cnidoscolus chayamansa* McVaugh)

Planta de la familia de las Euforbiáceas. Es un arbusto liso, de 2 a 3 m de alto. Presenta ramillas delgadas, corteza gruesa, casi blanca, con algunos pelillos algo urticantes y las hojas presentan tres lóbulos. Tiene sabia lechosa y pequeñas flores blancas durante el verano (Fig. 3).

Otros nombres comunes: Se pueden distinguir cuatro variedades cultivadas de esta planta a las que se les conoce por el nombre de chaya estrella, chaya picuda, chaya redonda y chayamansa (Ross-Ibarra y Molina-Cruz, 2002) En la región maya de Quintana Roo se le llama chaykol o xchay.

Sinonimia: *Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) I.M.Johnst. (The Plant List, 2013) y *Cnidoscolus aconitifolius* subsp. *Aconitifolius* (Trópicos.org)

Distribución: Se cultiva en climas cálidos subhúmedos y requiere suelos bien drenados. Es nativa de Tabasco y Yucatán pero se ha podido distribuir fácilmente en otras regiones con clima similar. Es una especie asociada a la región maya de México y Centroamérica. A diferencia de los otros dos quelites en estudio que se colectan, la chaya suele ser cultivada en traspatios o solares donde la gente los conserva para su comercio local o autoconsumo.

Usos: En México, su principal uso es como alimento o forraje para animales. Se ha demostrado que la chaya es una buena fuente de vitaminas (ácido ascórbico y beta-caroteno) y minerales (calcio, potasio y hierro) aún después de su cocción y que, en comparación con la espinaca, posee más proteína y fibra (Kuti y Kuti, 1999).

Además de su importancia como alimento, la chaya también presenta propiedades medicinales que han sido reportadas desde antes de la conquista (Ross-Ibarra y Molina-Cruz, 2002). Se ha empleado para tratar diabetes, alta presión sanguínea, desordenes renales, pérdida de peso, colesterol elevado e inflamación de brazos y piernas (Bautista-Cruz *et al.*, 2011).

Dentro de los quelites estudiados en el presente trabajo, la chaya es la especie que ha sido mayormente estudiada. Se cuenta con estudios farmacológicos y químicos que buscan probar la eficiencia en su uso como medicina o alimento. En un estudio a cargo de Kuti y Konuru en 2004 se determinó el contenido total de fenoles en extractos de hojas crudas y cocidas de chaya y su correlación con el efecto antioxidante. Se encontró un contenido de fenoles menor en las hojas cocidas en comparación con hojas crudas, pero el efecto antioxidante se mantiene proporcional a ellos.

Además se ha encontrado que algunos extractos como hexánico y etanólico poseen una cantidad importante de esteroides y flavonoides, respectivamente así como cumarinas y lignanos. Estos fitoquímicos son responsables de la actividad

antioxidante atribuida a la planta (García-Rodríguez, *et al.*, 2014). Otros de los fitoquímicos reportados en extractos obtenidos a partir de la chaya son los alcaloides, presentes en extractos acuosos y etanólicos.

Se ha reportado que el extracto acuoso de chaya reduce el colesterol en modelos animales (27.9 y 31.1% para dosis de 50 y 100 mg/kg respectivamente) (Miranda-Velasquez *et al.*, 2010).



**Figura 3.** Hojas de chaya (Foto: Proyecto CONACyT No. 214286)

#### *3.4 Propiedades de plantas comestibles y de uso medicinal*

Es una verdad conocida que las plantas son una fuente importante de sustancias que pueden reportar un beneficio al ser consumidas, es decir, contienen sustancias que tienen efectos sobre el cuerpo humano que modifican su funcionamiento. A estos compuestos se les denomina *bioactivos* de manera general y *fitoquímicos* cuando provienen de una fuente vegetal.

En los últimos años las plantas han sido estudiadas y consideradas como agentes terapéuticos alternativos para el tratamiento de enfermedades infecciosas debido a sus compuestos bioactivos naturales tales como fenoles, flavonoides y taninos, entre otros (Erdem *et al.* 2015).

También hay alimentos que conservan esta cualidad como son las bebidas hechas con café, cacao o té, que son conocidas por su efecto en el sistema nervioso. La fibra alimentaria presente en muchas plantas (como los nopales y otros alimentos de uso común en México) favorece el movimiento del tubo digestivo y además hace más lenta la absorción de azúcares.

Esto ha dado lugar a lo que se llama alimentos funcionales, que se refiere a aquellos a los que se les ha demostrado una o más funciones benéficas para el organismo, ya sea para el bienestar, salud o para la reducción del riesgo de una enfermedad, más allá de efectos nutricionales adecuados. Un alimento funcional debe reportar dichos beneficios al ser consumido en cantidades normales de la dieta (Diplock *et al.*, 1999).

Entre algunos ejemplos de alimentos funcionales, destacan los alimentos que contienen determinados minerales, vitaminas, ácidos grasos o fibra alimenticia, los alimentos a los que se han añadido sustancias biológicamente activas, como los fitoquímicos u otros antioxidantes, y los probióticos, que tienen cultivos vivos de microorganismos beneficiosos.

El concepto es atractivo aunque aún resulta complicado demostrar sus efectos, precisar las sustancias responsables y los mecanismos de acción y, además, demostrar que dichos efectos son independientes de su función en la nutrición. Es por ello que la búsqueda de dichos beneficios en los alimentos, de pie a numerosas investigaciones.

El estudio de los quelites ofrece resultados prometedores en cuanto a su contenido de nutrimentos y, en algunos casos, de sustancias bioactivas con propiedades interesantes en el campo de la salud. Entre las sustancias bioactivas que se han identificado en los quelites figuran:

- Polifenoles y flavonoides. Antioxidantes que se asocian con la prevención de enfermedades cardiovasculares y otras ligadas con el estrés oxidativo entre las que se encuentran la aterosclerosis, trombosis, infarto al miocardio, accidente vascular e hipercolesterolemia. (Quiñones *et al.*, 2012) También hay algunos flavonoides como el resveratrol, que además de su actividad antioxidante presenta actividad antimicrobiana en particular contra *H. pylori* (Mahady *et al.*, 2003), y es capaz de ayudar al control del cáncer generado por la infección de esta bacteria debido a que

regula la proliferación celular en algunas líneas celulares cancerígenas (Aggarwal *et al.*, 2004).

- Ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y omega-6, que pueden tener efectos antitrombóticos y de reducción de concentraciones de colesterol y triglicéridos en el plasma (Tellez, 2005).

Dados estos descubrimientos, se han incrementado las evidencias epidemiológicas y farmacológicas de las propiedades nutraceuticas de compuestos bioactivos presentes en las plantas comestibles contribuyendo a la prevención y reducción de padecimientos cardiacos, diabetes, hipertensión, Alzheimer y arterioesclerosis, entre otros de origen oxidativo (Chaturvedi *et al.*, 2011; Kaisoon *et al.*, 2011).

En México, la medicina tradicional también va de la mano con el conocimiento de las plantas que se pueden obtener en la milpa. Un gran número de plantas que son usadas como alimento, al mismo tiempo se les atribuyen propiedades medicinales contra ciertos padecimientos.

Actualmente se ha visto que muchas de estas plantas usadas en la medicina tradicional contra padecimientos de tipo gástrico, actúan también de manera directa sobre el principal agente causal de la gastritis y la úlcera péptica, la bacteria *Helicobacter pylori*.

Trabajos como los de O'Mahony *et al.* en 2005 y de Castillo-Juárez y Romero en 2007 indican que especies utilizadas en la alimentación tradicional mexicana y que podrían considerarse como ETSS, presentan actividad contra *H. pylori*.

La búsqueda de propiedades anti-*Helicobacter pylori* en plantas es relativamente reciente. El primer reporte que se tiene es el de Cassel-Beraut, *et al.* (1991) y es a partir de los últimos años que este tipo de estudios ha aumentado considerablemente en el afán de encontrar terapias alternativas que ayuden a incidir en enfermedades que afectan a la población.

Para el 2007, se tenían reportes de al menos 327 plantas, de uso medicinal y comestible, a las que se les habían analizado su potencial anti *H. pylori*, de las cuales, el 60% presentó alguna actividad positiva en los ensayos *in vitro* (Castillo-Juárez y Romero, 2007).

### 3.5 Acerca del descubrimiento y clasificación de *Helicobacter pylori*

Hasta la década de 1970, se creía que el estómago y en general cualquier tejido dentro del organismo humano, eran tejidos estériles donde la presencia de microorganismos estaba ligada a procesos patológicos que modificaban sus condiciones normales.

Los primeros reportes de microorganismos en biopsias de estómago son de Bizzozero en 1893, pero fue hasta 1984 cuando dos investigadores australianos: Barry Marshall (patólogo-biólogo) y Robin Warren (gastroenterólogo clínico) (Fig. 4), publicaron un trabajo donde describían a una bacteria bacilar que encontraron en biopsias de pacientes con gastritis y ulcera péptica. En su trabajo lograron cultivar la bacteria, demostrar los postulados de Koch y probar que los efectos de la enfermedad causada por la bacteria se revertían al usar antibióticos (Marshall y Warren, 1984) Dicho trabajo les valió el Premio Nobel de Medicina o Fisiología en 2005.



**Figura 4.** Barry J. Marshall y J. Robin Warren (Foto: Julietta Jameson, 2011. Tomada de <http://www.australiaunlimited.com/science/hands-across-the-water> Mayo, 2016)

En un inicio, la bacteria descrita fue clasificada dentro del género *Campilobacter* por guardar similitudes como su morfología curva, ser microaerofílica,



crecimiento en medios ricos, sensibilidad al metronidazol y contenido de G-C en el ADN (34%). Posteriormente se demostró mediante estudios de microscopia que la bacteria poseía flagelos unipolares a diferencia de los flagelos bipolares típicos del género *Campilobacter*. Estudios bioquímicos indicaron diferencias en el tipo de proteínas y ácidos grasos, así como el análisis de la secuencia de RNAr 16s que demostró una distancia suficiente para excluir a la bacteria de dicho género (Romaniuk *et al.*, 1987).

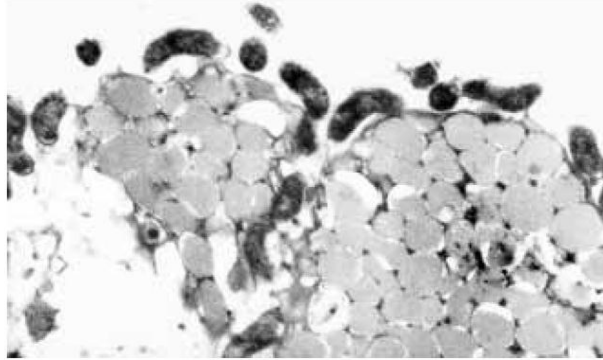
Ante esta evidencia se creó un nuevo género denominado *Helicobacter* y donde su primer miembro fue *H. pylori* (Goodwin *et al.*, 1989). Actualmente la bacteria se clasifica de la siguiente manera de acuerdo con Madigan y colaboradores (2015):

Dominio: Bacteria  
Phylum: Proteobacteria  
Clase:  $\epsilon$ -Proteobacteria  
Orden: Campylobacterales  
Familia: Helicobacteraceae  
Género: *Helicobacter*  
Especie: *Helicobacter pylori*

### *3.6 Morfología y generalidades microbiológicas*

*H. pylori* es una bacteria Gram-negativa y polimórfica, es decir, presenta forma espiral o bacilar en condiciones óptimas pero puede presentar forma cocoide en condiciones no favorables (Fig. 5). Mide entre 2.5 a 5  $\mu\text{m}$  de largo y 0.5 a 1  $\mu\text{m}$  de ancho, tiene de 2 a 6 flagelos unipolares de 2.5  $\mu\text{m}$  aproximadamente que le confieren movilidad. Se le considera una bacteria exigente pues solo crece en medios suplementados con 10% de sangre de carnero o suero fetal bovino; además crece en una atmósfera microaerofílica (10%  $\text{CO}_2$ ) con alta humedad, su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C y requiere de 2 a 7 días de incubación (Goodwin y Armstrong, 1990).

Produce las enzimas ureasa, catalasa y oxidasa que ayudan a su identificación bioquímica. Es fermentador de la D-glucosa y puede metabolizar algunos aminoácidos por fermentación similar a las bacterias anaerobias (Torres *et al.*, 2002).



**Figura 5.** Microscopia electrónica de alta resolución. Células epiteliales colonizadas con *H. pylori* (Warren, 1983)

### 3.7 Colonización y factores de virulencia

De manera normal, el aparato digestivo se encuentra protegido de infecciones gracias a la acidez gástrica, el ambiente del estómago y la peristalsis. *H. pylori* tiene la capacidad de evadir estas defensas primarias y puede establecer una infección persistente. Esto se debe a la capacidad de colonización y supervivencia de la bacteria, así como a los factores de virulencia que le permiten desarrollar diversas patologías (Testerman *et al.*, 2001).

#### 3.7.1 Factores de colonización.

Dentro de los factores de colonización de *H. pylori* (Fig. 6) se encuentra la enzima ureasa, dependiente del níquel y que se encuentra en el citosol y en la superficie de la bacteria. Esta enzima hidroliza la urea producida por el huésped, a CO<sub>2</sub> y amoníaco permitiendo a la bacteria neutralizar el medio ácido alrededor de ella cuando se encuentra en el estómago (Sachs *et al.*, 2001).

A pesar de su capacidad para resistir la acidez de los jugos gástricos, *H. pylori* tiene preferencia por ambientes con un pH más cercano a la neutralidad. Para esto cuenta con sus flagelos que le permiten moverse a través de la mucosa

gástrica hacia la capa basal de células epiteliales donde es quimioatraída por el pH cercano a 7, la presencia de urea y bicarbonato de sodio (Kao *et al.*, 2016; O'Toole *et al.*, 2000; Schreiber *et al.*, 2004).

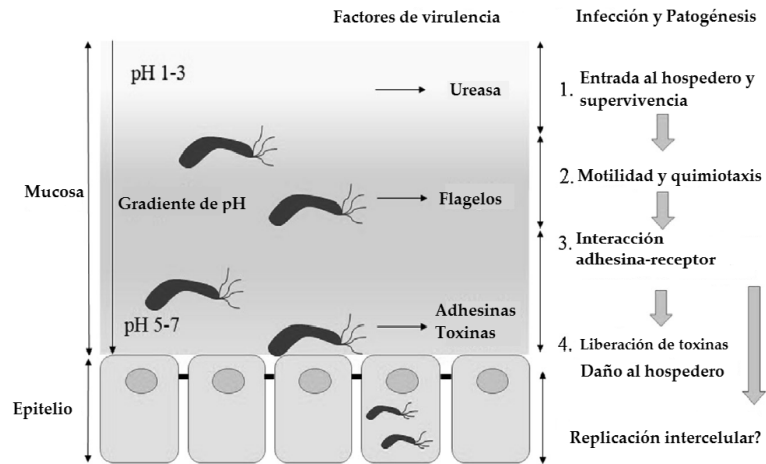
En los estudios de Eaton y colaboradores en 1996, se demostró que la movilidad mediada por flagelos es esencial para la colonización de *H. pylori* en la mucosa gástrica de modelos animales.

Como parte del mecanismo de colonización de la bacteria, ésta debe ser capaz de adherirse a las células del epitelio gástrico. *H. pylori* posee glicoproteínas o glicolípidos denominados adhesinas que interactúan con los receptores del hospedero en la matriz extracelular. Una vez que la bacteria ha logrado adherirse, obtiene los sustratos necesarios para replicarse de manera adecuada y liberar toxinas que dañen las células del huésped (Kao *et al.*, 2016; Testerman *et al.*, 2001).

La adhesión es necesaria para que *H. pylori* pueda colonizar el epitelio y establecer una infección. Cabe mencionar que hay otros factores que influyen en la persistencia de la bacteria en la mucosa gástrica, como son el recambio celular, respuesta inmune del hospedero y el contenido gástrico. Modelos *in vitro* permiten el estudio de la adhesión de manera independiente.

Actualmente las adhesinas mejor estudiadas son *BabA* que se adhiere a los antígenos de Lewis B del huésped mediante residuos de fucosa (Walz *et al.*, 2005) y *SabA* que se une a los antígenos de Lewis X de las células de la mucosa gástrica mediante ácido siálico (Aspholm *et al.*, 2006).

Se conocen aproximadamente otras 40 adhesinas para *H. pylori* que le permiten adaptarse a distintas condiciones dentro del hospedero. No todas las adhesinas se expresan de igual manera pues son variables respecto a la cepa y morfología bacteriana, las condiciones de cultivo, la etapa de desarrollo de la enfermedad del paciente y la variedad de receptores expresados en las células del epitelio gástrico (Testerman *et al.*, 2001).



**Figura 6.** Diagrama de infección y patogénesis de *H. pylori*. (Modificado de Kao *et al.*, 2016)

### 3.7.2 Factores de virulencia.

Después de que *H. pylori* ha logrado adaptarse al ambiente del estómago y permanecer ahí, utiliza diversas moléculas que le permiten causar daño en la mucosa, estas moléculas son conocidas como factores de virulencia y algunos se describen brevemente a continuación.

- Citotoxina Vacuolizante (VacA). Proteína que induce la vacuolización, así como múltiples actividades celulares que incluye: la formación de canales en la membrana celular, liberación del citocromo C de la mitocondria (que induce apoptosis) y se une a los receptores de las células de la membrana iniciando una respuesta proinflamatoria. Todas las cepas de la bacteria poseen el gen que codifica para esta proteína (Cervantes-García, 2016).

- Isla de patogenicidad *cag* (*cagPAI*). Contiene más de 30 genes que no se expresan constitutivamente, sino que responden a señales ambientales. Están regulados por complejos mecanismos que pueden activarse o no, dependiendo de condiciones microambientales. Las cepas *cagPAI* se encuentran con mayor frecuencia en pacientes con úlcera péptica y cáncer gástrico.

- Citotoxina asociada al gen A (CagA). Este gen se utiliza como un marcador de la isla *cagPAI*. La producción de esta proteína se potencia por la presencia de un pH ácido y es mediada por un sistema de secreción tipo IV. Induce la

producción de citocinas inflamatorias, como la IL-8, y el reclutamiento de leucocitos. El efecto directo sobre las células gástricas es la reducción de la secreción de ácido (Jones *et al.*, 2009).

- Lipopolisacárido (LPS). Es un factor de virulencia que posee en su antígeno O los carbohidratos de Lewis x, Lewis y, o ambos, cuyo papel fundamental en la patogénesis es evadir la respuesta inmune durante la colonización del epitelio gástrico, favoreciendo la persistencia bacteriana en el microambiente, equilibrando la acción de inducir la respuesta autoinmune del hospedero contra sus propias células gástricas.

### *3.8 Patologías asociadas a Helicobacter pylori*

La infección por *H. pylori* no en todos los casos presenta síntomas o complicaciones, pero si significa un riesgo de desarrollar alguna de las patologías a las que se encuentra asociada.

Las enfermedades relacionadas con la infección por *H. pylori* incluyen principalmente a la gastritis crónica activa, úlcera péptica (gástrica y duodenal), displasia gástrica, carcinoma y linfoma gástrico tipo MALT. El desarrollo, tipo y gravedad de los trastornos gastrointestinales depende de la cepa bacteriana, de la fisiología y predisposición genética del hospedero, así como de diversos factores ambientales particulares para cada caso (Atherton, 2006).

#### 3.8.1 Gastritis.

En las últimas décadas de estudio, se ha reconocido a *H. pylori* como el principal agente causal de la gastritis crónica activa. Los síntomas de esta patología incluyen ardor o dolor en la parte superior del abdomen, náuseas, vomito e inapetencia.

Este padecimiento presenta inflamación de la mucosa y submucosa gástrica provocada por los mecanismos de colonización de *H. pylori*, que penetra a través de dicha capa del estómago y se multiplica en proximidad a las células epiteliales superficiales (Dixon, 2001). Cuando la bacteria empieza a colonizar la

mucosa, el huésped presenta en general dos mecanismos de defensa: uno inflamatorio en la fase aguda y uno inmune en la fase crónica.

La gastritis aguda, de corta duración, se caracteriza por una intensa proliferación bacteriana y disminución del ácido ascórbico en el jugo gástrico (Lee *et al.*, 1995) Por su parte, la gastritis crónica que persiste por meses o años, se caracteriza por el arribo de células plasmáticas y linfocitos a la mucosa lo que produce la síntesis de anticuerpos que incrementan la reacción inflamatoria (Dixon, 2001).

### 3.8.2 Úlceras pépticas.

En caso de que la infección persista por un tiempo prolongado, se puede llegar a un daño mayor conocido como gastritis crónica atrófica o úlcera, que consiste en la pérdida del tejido y alteración de la estructura epitelial que deriva en una ruptura de la mucosa que protege al estómago debido a la secreción ácida del estómago y toxinas liberadas por *H. pylori*. Se produce daño vascular, necrosis del tejido y disminución en el aporte de nutrientes. (Kuster *et al.*, 2006).

Se estima que de 10-15% de las personas infectadas con *H. pylori* llegan a desarrollar algún tipo de úlcera (Logan y Walker, 2001). Por su localización existen dos tipos de úlceras: gástricas o duodenales. *H. pylori* es responsable del 90% aproximadamente de úlceras duodenales y del 70 a 75% de úlceras gástricas. Existen evidencias de que la úlcera se puede revertir después de erradicar a la bacteria (Blaser y Atherton, 2004).

### 3.8.3 Cáncer gástrico.

*H. pylori* es considerada la principal causa de adenocarcinoma gástrico distal. La OMS clasificó a la bacteria como carcinógeno de grupo 1 (definitivamente carcinógeno), es decir, *H. pylori* está directamente asociado a carcinogénesis con base en los estudios epidemiológicos disponibles (IARC, 1994).

El cáncer gástrico está asociado al desarrollo de displasia y metaplasia intestinal causadas por la infección prolongada con *H. pylori*. De manera general, el

cáncer gástrico solo se presenta en aproximadamente del 1 al 3% de la gente infectada con la bacteria (Blaser y Atherton, 2004) y depende también en gran medida de la cepa de *H. pylori* que afecte al hospedero. Esta enfermedad representa de manera mundial la tercera causa de muerte por cánceres (Ferlay *et al.*, 2014). Se sabe también que los pacientes con úlceras duodenales inducidas por *H. pylori*, son menos propensos a desarrollar cáncer gástrico en el futuro (Atherton, 2006).

### 3.9 Epidemiología

La infección por esta bacteria es un problema mundial pues se estima que más del 50% de la población es *H. pylori* positiva. La prevalencia de esta infección presenta variación geográfica pues en países en vías de desarrollo se estima que aproximadamente 80% de población está infectada con *H. pylori* (Vale y Vítor, 2010), mientras que en países desarrollados este valor es de 40% y es menos frecuente en niños y adolescentes (Pounder y Ng, 1995).

De acuerdo con Malaty y Graham (1994), la prevalencia de *H. pylori* se correlaciona con el nivel socioeconómico, principalmente con las condiciones de vida durante la infancia, higiene y saneamiento.

En México se determinó la presencia de esta infección en el 66% de 11,605 sueros representativos de la población, en donde más del 80% de los adultos estaban infectados a los 25 años de edad (Torres *et al.*, 1998).

Por otro lado, se ha determinado que en algunas regiones rurales consideradas de riesgo, como las comunidades indígenas en Chiapas, se presenta una alta incidencia de cáncer gástrico asociado a la bacteria (Molhar *et al.*, 2002).

### 3.10 Tratamiento.

La erradicación de la bacteria es la única manera en la que se pueden combatir las enfermedades que su infección causa. La primera línea de tratamiento es la llamada terapia triple que consiste en administrar dos antibióticos (se puede incluir amoxicilina, metronidazol, tetraciclina y claritromicina) y un inhibidor de

la bomba de protones (omeprazol, lanzoprazol, entre otros). Este tratamiento, con una duración de 10 a 14 días presenta una efectividad del 80% (Collins *et al.*, 2006). En caso de que esta terapia falle debido a la resistencia de la bacteria a los antibióticos, se procede con la terapia cuádruple, que consiste en utilizar dos antibióticos distintos a los de la terapia inicial, un inhibidor de la bomba de protones e incluye además sales de bismuto como protector de la mucosa.

Se recomienda la erradicación de la bacteria únicamente en los casos en los que se presente ulcera péptica, gastritis atrófica y metaplasia intestinal, linfoma tipo MALT y por historial de cáncer gástrico (personal o familiar).

Actualmente, la búsqueda de tratamientos alternativos para erradicar o controlar la infección por *H. pylori* ha ido en aumento debido a la resistencia generada por las cepas de la bacteria. En los últimos años se han realizado importantes esfuerzos para encontrar compuestos que eviten la colonización del epitelio gástrico por la bacteria.

Se busca que inhiban la adhesión entre la bacteria y el epitelio gástrico, que sean agentes que inhiban la motilidad bacteriana y que inhiban a la enzima ureasa (Nobata *et al.*, 2002; Pastene *et al.*, 2009; Paulo *et al.*, 2011). Debido a que hasta la fecha, no hay una vacuna contra *H. pylori*, la inhibición de los procesos de colonización de la bacteria, permitiría incidir en la prevención o profilaxis de los padecimientos que ocasiona.

La medicina y plantas tradicionales son una de las principales líneas de investigación para aportar datos científicos que avalen su uso y sirvan en el tratamiento y prevención de las patologías asociadas a *H. pylori*.



## **IV. Hipótesis**

Existen referencias de quelites de la dieta tradicional mexicana que presentan actividad contra *H. pylori*, por lo que se espera encontrar que los extractos o alimentos preparados a partir de las especies seleccionadas en este estudio, actúen sobre el crecimiento de la bacteria o sobre su proceso de adherencia a las células del epitelio gástrico.

## **V. Objetivos**

### *5.1 Objetivo general*

Determinar el potencial anti-*H. pylori in vitro* de extractos y alimentos preparados a partir de las ETSS seleccionadas: Alache (*Anoda cristata*) Chepil (*Crotalaria longirostrata*) y Chaya (*Cnidocolus chayamansa*) con el propósito de darles valor agregado como alimento para que puedan ser revaloradas y reincorporadas a la dieta contemporánea.

### *5.2 Objetivos específicos*

- a) Obtención de extractos de diclorometano-metanol y acuosos de las tres especies de quelites.
- b) Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias del crecimiento bacteriano para cada uno de los extractos y alimentos preparados, como medida de la actividad anti-*H. pylori*, por el método de dilución en cultivo líquido.
- c) Determinación del efecto antiadherente de *H. pylori* a células de adenocarcinoma gástrico de extractos y alimentos preparados a partir de quelites, mediante la cuantificación de la fluorescencia residual utilizando bacterias marcadas con un fluorocromo.

## VI. Metodología

### 6.1 Materiales y reactivos

El diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) y etanol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ) se compraron de Merck (Darmstadt, Germany). La acacetina se compró en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). La diosmetina fue comprada en Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, Texas, USA). Todos los demás reactivos químicos y materiales empleados en este trabajo fueron seleccionados de la mejor calidad y se especifican en cada sección de la Metodología.

### 6.2 Obtención del material vegetal.

Los alaches fueron colectados en Nepantla, Edo. de México y fueron identificadas por el Dr. Robert Bye y la Mtra. Edelmira Linares del Instituto de Biología, UNAM. (No. Colecta: E. Linares 2786 y R. Bye). Los chepiles fueron obtenidos en el mercado local del municipio de San Antonio Castillo en Ocotlán, Oaxaca por la Mtra. Gladys Manzanero Medina del CIIDIR Oaxaca, Instituto Politécnico Nacional. Finalmente, la chaya fue colectada en Timucuy y San Pedro Chumay en Yucatán por la Dra. Amanda Gálvez y la Mtra. Clarisa Jiménez Bañuelos del Jardín Botánico Regional, CICY.

### 6.3 Preparación de extractos.

Extractos diclorometano-metanol 1:1 (**DM**). Se obtuvieron por maceración exhaustiva de 50 g de planta seca y molida con 500 ml de la mezcla de solventes durante 72 h. Se filtró el disolvente y se evaporó en un rotaevaporador a presión reducida. El residuo, correspondiente al extracto, fue secado a temperatura ambiente y se obtuvo su rendimiento.

Extractos acuosos (**AQ**). Se obtuvieron mediante la infusión de 10 g de planta seca y molida que se mantuvo en 500 ml de agua destilada hervida durante 30 min. La infusión se filtró y fue liofilizada para obtener el extracto seco. En el caso de alache y chepil, a la infusión filtrada se le agregó etanol en proporción 1:1 para precipitar el mucílago presente (Rodríguez-González *et al.*, 2011), el

cual fue separado mediante centrifugación (6,000 rpm, 15 min). El etanol remanente se elimina en un rotaevaporador a presión reducida. El extracto fue liofilizado y se obtuvo su rendimiento.

Por su parte, los mucílagos (**MU**) que precipitaron con la partición con etanol, se recuperaron y fueron centrifugados a 5,000 rpm, 10 min para eliminar los restos de solvente. El precipitado se secó en horno de convección (70°C, 5 h.) y se obtuvo el rendimiento de los mucílagos.

#### *6.4 Preparación de alimentos y muestras utilizadas*

Los alimentos para cada especie de quelites fueron estudiados, estandarizados y preparados en el Laboratorio de Evaluación Sensorial de la Facultad de Química, UNAM. Todos ellos se prepararon a partir de recetas tradicionales mexicanas (ver Ayala-Alcántara, 2016 y García-Torres, 2015 para la descripción completa). A continuación se presenta solo una breve descripción de cada uno de ellos:

##### 6.4.1 Alimento de alache.

Este es un guisado caldoso preparado con la planta fresca y limpia a la que se le agrega agua en cantidad suficiente para ser hervida. Al guisado hirviendo se le agregan sal y tequesquite disueltos junto con cebolla picada. Se deja hervir por 30 min más hasta que las hojas estén perfectamente cocidas.

##### 6.4.2 Alimento de chepil.

Para esta especie de quelite, se elaboró un tamal tipo oaxaqueño con un contenido de 1.4% de chepil deshidratado. La elaboración requiere de batir manteca de cerdo (8%) con polvo para hornear y masa nixtamalizada, posteriormente se incorpora sal y chepil limpio y deshojado, se mezcla. Se usan hojas de plátano engrasadas, previamente asadas y limpias, en las que se pone media taza de masa y se envuelven usando plástico adherente para evitar la pérdida de humedad. Los tamales se cuecen en vaporera (baño maría) durante 1.5 h. Después de la cocción, los tamales se dejan reposar en la vaporera por 15 min.

#### 6.4.3 Alimento de chaya.

Para esta especie se utilizó la receta tradicional del agua de chaya, consumida en la región de Yucatán y Campeche. Se elaboró usando para 1 l. de agua, 260 g. de chaya molida, 110 g. de azúcar y 60 ml de jugo de limón.

#### 6.4.4 Procesamiento de las muestras de alimento.

Cada alimento fue procesado de acuerdo a sus características para obtener la muestra final seca y pulverizada para su uso en los ensayos detallados más adelante.

En el caso del alache, el guisado caldoso fue secado y pulverizado para su manejo. También se estudió el efecto anti-*H. pylori* del mismo guisado pero sin el alache, para determinar el efecto de los condimentos por separado, a lo que denominamos "blanco del alimento".

Para la muestra del alimento de chepil, debido a la complejidad del mismo, se optó por mantener aislada la cantidad de chepil utilizado en el platillo original, la cual se colocó al centro del tamal y se cocinó como previamente se indicó. Una vez terminado el cocimiento del tamal, el chepil en su interior se separó, se secó y pulverizó. Esta muestra fue la utilizada para los ensayos anti-*H. pylori*. No se trabajó con una muestra del resto de los ingredientes como "blanco".

Con respecto al alimento de chaya, se estudió el efecto anti-*H. pylori* del agua completa liofilizada y también de un preparado de agua sin la chaya, para evaluar el efecto del resto de los ingredientes (blanco del alimento).

#### 6.5 Cultivo e identificación de *Helicobacter pylori*.

Los medios de cultivo empleados para el manejo de *H. pylori* son los siguientes.

- Medio de cosecha: 28 g/l de caldo Brucella (DIFCO) con glicerol (10%) y suero fetal bovino estéril (Gibco BRL). Se adiciona con 10 mg/l de vancomicina.

- Placas para cultivo agar Casman-sangre: 42 g/l de agar Casman con sangre de carnero al 5% y 4 antibióticos [vancomicina (10 mg/l), trimetropina (5 mg/l), polimixina (2.5 mg/l) y anfotericina (2 mg/l)].
- Caldo Mueller-Hinton: 21 g/l de medio Mueller-Hinton Broth (DIFCO) con  $\beta$ -ciclodextrina (0.2%) y los 4 antibióticos en las concentraciones ya indicadas en el punto anterior.
- Placas para cuenta viable (determinación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC)) 43 g/l de agar Casman con  $\beta$ -ciclodextrina al 0.2%. Se esteriliza a 121°C por 20 min y se agrega vancomicina 10 mg/l.

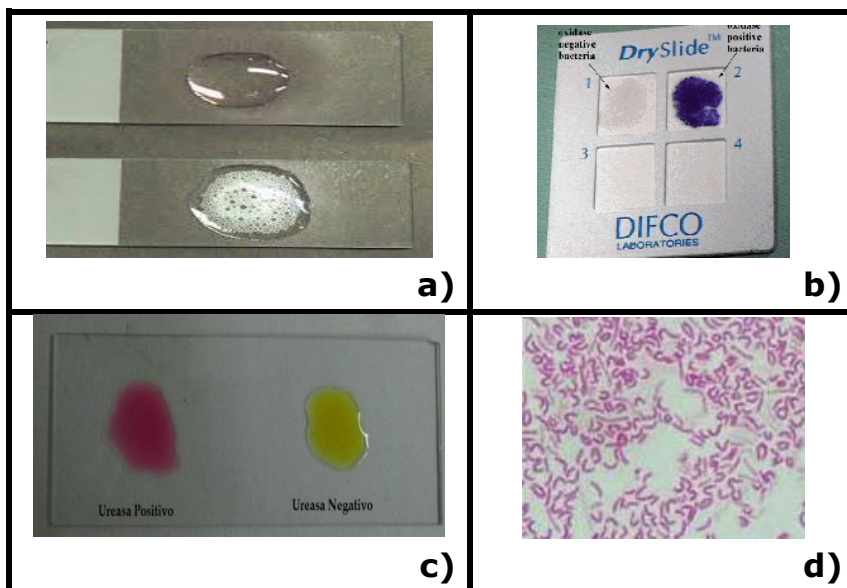
Se usó la cepa ATCC 43504 de *H. pylori* conservada a -70°C en medio de cosecha en viales con peso conocido. Para preparar un lote homogéneo de bacterias para usarse en los experimentos de actividad antibiótica y anti-adherencia, se sembraron 10 mg de bacterias por caja en placas con medio agar Casman-sangre, las cuales se introducen en una incubadora Nuaire TS autoflow a 37°C con 10% de CO<sub>2</sub> y 5% de O<sub>2</sub> durante 24 h. Posteriormente, las bacterias son colectadas en tubos con medio de cosecha, se pesan para calcular el rendimiento y se mantienen en congelación a -70°C hasta su utilización.

Después de cada cosecha se realizan pruebas de identificación del lote. Tres bioquímicas, más la tinción de Gram (Fig. 7)

- Catalasa. En un portaobjetos se ponen unas gotas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 40% y se les adiciona con el asa de siembra una pequeña cantidad de cultivo. La prueba es positiva si hay producción de burbujas (O<sub>2</sub>) generadas por la acción de la enzima al descomponer el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en agua y oxígeno.
- Oxidasa. La citocromo oxidasa es capaz de oxidar la dimetil-p-fenilindiamina en presencia de oxígeno formando un complejo colorido (azul-púrpura). En un cuadro de una placa del kit Dry Slide Oxidase (DIFCO) que contiene dimetil-p-fenilindiamina, se coloca un poco de

cultivo. Si la bacteria es oxidasa positiva, se observa una coloración azul intenso en unos cuantos segundos.

- Ureasa. Usando una solución de urea 6 M a pH 7 y 0.05% de rojo de fenol. Se coloca una gota de esta solución en un portaobjetos y se agrega una asada de bacterias. La prueba es positiva cuando el color de la solución vira de color naranja a un color rosa-rojo debido a la alcalinización del medio.
- Tinción de Gram. A partir del cultivo, se toma una asada de bacterias y se extiende en un portaobjetos con una gota de agua. Se realiza la tinción de Gram estándar. Si la bacteria se tiñe de color rojizo por la safranina, quiere decir que la bacteria es *Gram-negativa*. La morfología se verifica, observando las formas típicas de la bacteria: forma de bacilo o de **U** en cultivos jóvenes.



**Figura 7.** Pruebas bioquímicas para la identificación de *H. pylori*: catalasa **a)**, oxidasa **b)**, ureasa **c)** y tinción de Gram **d)** en un lote nuevo de bacterias.

### 6.6 Determinación de la actividad anti-*H. pylori*

Se evaluó mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de dilución en cultivo líquido.

Se preparó un cultivo de *H. pylori* en medio líquido Mueller-Hinton. El cultivo debe tener un valor aproximado de  $A_{600} = 0.230$  medido con un espectrofotómetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech) para ser incubado por 5 h en condiciones microaerófilas y en agitación constante (37°C, 10% de CO<sub>2</sub> y 150 rpm), hasta obtener una lectura de  $A_{600} = 0.300$ , que indica que la bacteria se encuentra al inicio de la fase logarítmica de crecimiento (10<sup>8</sup> UFC/ml aproximadamente).

Los extractos de **DM** y **AQ** se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) y agua, respectivamente, el mismo día del experimento. Las concentraciones finales de extractos en el ensayo fueron de 15.63, 31.25, 62.5, 125, 250 y 500 µg/ml.

El mucílago obtenido se disolvió en agua destilada y las concentraciones finales en el ensayo fueron de: 15.63, 31.25, 62.5 y 125 µg/ml.

Las muestras del alimento de alache y chepil no son solubles en agua por lo que se utilizó directamente el polvo en cada pozo de prueba a concentraciones finales de 62.5, 125, 250 y 500 µg/ml sin lograr que se solubilizaran completamente. En el caso del alimento de chaya, que si es soluble, se usaron las mismas concentraciones finales que los otros alimentos.

Las pruebas se realizaron en placas de 24 pozos, agregando a cada uno 1.5 ml del cultivo de bacterias a una  $A_{600} = 0.300$  más 10 µl del tratamiento a probar. Dichas pruebas se realizaron por triplicado usando como controles negativos 10 µl de DMSO o agua y como control positivo se emplearon los antibióticos de referencia metronidazol y amoxicilina. Después de agregar la muestra al cultivo, se tomó una alícuota de 600 µl para tomar una lectura inicial (**Ai**). La placa se incubó por 24 h en las condiciones microaerófilas, de temperatura y agitación descritas y luego de este tiempo se toma una lectura final (**Af**).

El valor de la CMI se obtiene calculando primero el cambio de la absorbancia ( $\Delta A_{600}$ ) de cada cultivo tanto de los controles, como de los tratamientos experimentales, con la siguiente fórmula:

$$\Delta A = A_f - A_i$$

El porcentaje de crecimiento bacteriano (%C) se calcula utilizando el valor promedio de absorbancia de los controles ( $\Delta A_c$ ) y de los datos experimentales ( $\Delta A_e$ ):

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

Con éste porcentaje de crecimiento bacteriano se obtiene el porcentaje de inhibición (%I) de las muestras probadas, así como de los antibióticos de referencia (amoxicilina y metronidazol).

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

### *6.7 Cultivo y manejo de células AGS*

Para el cultivo y propagación de la línea celular se utilizó medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM GIBCO) suplementado con 5% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina (GIBCO), 1 mg/ml de insulina (SIGMA), 2 mM de piruvato de sodio (GIBCO) y 100 U/ml/100 µg/ml de penicilina/estreptomicina (GIBCO). Las células se cultivaron a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%

#### 6.7.1 Propagación de la línea celular

Se utilizó la línea celular epitelial AGS derivada de adenocarcinoma gástrico humano ATCC 1739, la cual es conservada en viales a -70°C. Para la realización de un nuevo cultivo se descongelaron el número necesario de viales y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min, posteriormente se retiró el medio sobrenadante y se agregaron 200 µl de medio D-MEM suplementado para resuspender el botón celular. Esta suspensión se agregó en una caja Petri (10 mm) con 8 ml de D-MEM suplementado y se incubaron en las condiciones ya descritas.

Para poder propagar la línea celular las células deben llegar a una confluencia de 90%, entonces se retira el medio de cultivo y se hacen dos lavados con 5 ml de PBS 1X estéril, cada uno. Se agregan 500 µl de tripsina/EDTA para eliminar



las uniones célula-célula y se incuban 5 min a 37°C para promover el desprendimiento de las células de la caja. Posteriormente, se inactivó la tripsina con 2 ml de D-MEM suplementado y las células desprendidas se colectan en un tubo cónico para centrifugarse (1,500 rps/ 5 min), se eliminó el medio y el botón celular se resuspendió en 5-8 ml de D-MEM para tomar una alícuota de 10 µl para conteo celular en la cámara de Neubauer.

#### 6.7.2 Conservación de células mediante ultracongelación

Al generar suficiente biomasa para propagar la línea celular, ésta se almacena en congelación para su posterior uso, evitando así la muerte y riesgo de contaminación de toda la línea celular.

Después de contar las células, provenientes de cajas confluentes, se colocó la cantidad de  $1 \times 10^6$ /ml células en un vial al que se le agregó medio D-MEM suplementado, adicionado con glicerol al 10% para su congelación a -70°C.

#### 6.7.3 Crecimiento de células para experimentos de adherencia

Para llevar a cabo los experimentos de adherencia se tomaron viales de la línea celular previamente propagada y se cultivaron hasta llegar a la confluencia deseada (90-95%) de la manera ya descrita, en medio D-MEM suplementado. Las células se desprendieron mediante la adición de Tripsina/EDTA y se realizó un conteo celular al microscopio en cámara de Neubauer.

En una caja de 96 pozos y paredes negras para cultivo celular y lectura de fluorescencia (NUNC), se sembraron  $1 \times 10^5$  AGS/ pozo con medio D-MEM suplementado, en un volumen final de 200 µl/pozo. Se incubó a 37°C por 24 h.

### *6.8 Determinación de la actividad de extractos sobre la adherencia de H. pylori a células AGS*

La determinación del efecto sobre la adherencia de *H. pylori* se realizó de acuerdo a lo descrito por Espinosa-Rivero y colaboradores en 2015 y se describe a continuación.

Se preparó un cultivo de *H. pylori* en 100 ml de medio Mueller-Hinton. El cultivo debe tener un valor aproximado de  $A_{600} = 0.170$  determinado con un espectrofotómetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech) para ser incubado por 16 h en condiciones microaerófilas y en agitación constante (37°C, 10% de CO<sub>2</sub> y 150 rpm). Se colectaron las bacterias en la fase logarítmica de su crecimiento y se centrifugó a 5,000 rpm por 5 min. Se eliminó el medio sobrenadante y el botón de bacterias se lava 2 veces con PBS 1X estéril, el botón de bacterias lavado se resuspendió en 10 ml de PBS. Las bacterias se alicuotaron en viales con  $1 \times 10^9$  UFC/ml para ser marcadas con 10 µl de Isotiocianato de fluoresceína (FITC) al 0.1% diluido en DMSO. Las bacterias marcadas y otro lote igual pero sin marcar (blanco) se incubaron a 37°C en oscuridad durante 1 h.

Después de la incubación, los viales son centrifugados a 1,000 rpm por 1 min y se elimina el sobrenadante. Cada vial se lavó 2 veces con 500 µl de PBS. Después de eliminar el sobrenadante, las bacterias marcadas se resuspenden en 900 µl de medio D-MEM sin suplementar. Las bacterias sin FITC (blancos) se resuspenden en PBS.

Los extractos **DM** y **AQ** obtenidos previamente se disolvieron en DMSO y agua, respectivamente, el mismo día del experimento. Las concentraciones finales en el ensayo fueron de 12.5, 25, 50, 100, 250 y 500 µg/ml.

El mucilago de alache y chepil fue disuelto en agua y las concentraciones finales en el ensayo fueron de 12.5, 25, 50, 100, 250 y 500 µg/ml.

Las muestras de alimento de alache y chepil no son solubles, por lo que se utilizó directamente el polvo en cada pozo de prueba a concentraciones finales de 50, 100, 250 y 500 µg/ml sin lograr la solubilización completa del mismo. En el caso del alimento de chaya, que si es soluble, se usaron las mismas concentraciones finales que los otros alimentos.

A las células AGS sembradas y pre-incubadas 24 h antes se les retiro el medio de cultivo y se les agregaron 80 µl de medio nuevo. Posteriormente se

infectaron con  $1 \times 10^8$  UFC de *H. pylori* marcadas con FITC y 10  $\mu$ l de cada tratamiento a probar. Se incubó la placa a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5% durante 1 h.

Como control máximo de fluorescencia (**F<sub>c</sub>**) se usaron bacterias marcadas con FITC, como control mínimo de fluorescencia se usaron células AGS y bacterias sin marcar (**F<sub>b</sub>**) y como control de adherencia máxima se usaron células AGS infectadas con *H. pylori* marcada con FITC con 10  $\mu$ l del vehículo correspondiente (DMSO o agua de acuerdo al tipo de extracto probado).

Después del tiempo de incubación se retira el medio de cultivo a las células y se lava con 180  $\mu$ l de PBS para eliminar los restos de extracto y bacterias no adheridas.

La adherencia se cuantificó mediante la medida de la fluorescencia de las bacterias marcadas con FITC adheridas a células AGS usando un espectrofotómetro (POLARstar Omega) con una longitud de onda de excitación de 460 nm y de detección de 544 nm. Cada prueba se realizó al menos por cuatuplicado y con al menos tres repeticiones independientes obteniendo el promedio del valor de fluorescencia para cada tratamiento. El porcentaje de inhibición de adherencia para tratamiento se calcula con las lecturas de fluorescencia usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Inhibición de la adherencia} = 100 - \frac{(\mathbf{F_t} - \mathbf{F_b}) \times 100}{\mathbf{F_c}}$$

## VII. Resultados y Discusión

Para iniciar el trabajo, se realizó una búsqueda bibliográfica acerca de la actividad antimicrobiana de las tres especies de quelites seleccionadas y se encontró que no habían sido evaluadas en su actividad contra *H. pylori*, a excepción del alache, al cual, el grupo de investigación donde se lleva a cabo la presente tesis, le realizó ensayos preliminares utilizando un extracto acuoso y uno metanólico de la especie (Castillo-Juárez, *et al.*, 2009).

### 7.1 Clasificación de muestras de quelites

La obtención de las tres especies de quelites utilizadas, fue realizada por el equipo de la Dra. Amanda Gálvez del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la UNAM. Para el caso del chepil, se pudo obtener una muestra de la planta silvestre y otra de chepil cultivado a partir de sus semillas y se decidió incluir a ambas en el estudio. En cuanto a la chaya, se colectaron dos muestras de localidades distintas y se decidió incluirlas también en el trabajo con el fin de observar si estos factores influyen en su posible actividad contra *H. pylori*. De esta manera, en la Tabla 1 se resumen las muestras que fueron probadas en este trabajo, así como las abreviaturas que se utilizarán para identificarlas.

**Tabla 1.** Clasificación de muestras experimentales de los quelites obtenidos

Quelite	Procedencia	Variedad	Tipo de extracto	Abreviatura
<b>Alache</b>	Estado de México	-	Extracto DM	Ala-DM
			Extracto Acuoso (sin mucílago)	Ala-AQ
<b>Chepil</b>	Oaxaca	<b>Silvestre</b>	Extracto DM	<b>CheS-DM</b>
			Extracto Acuoso (sin mucílago)	<b>CheS-AQ</b>
		<b>Cultivado</b>	Extracto DM	<b>CheC-DM</b>
			Extracto Acuoso (sin mucílago)	<b>CheC-AQ</b>

Quelite	Procedencia	Variedad	Tipo de extracto	Abreviatura
Chaya	Yucatán ( <b>San Pedro Chumay</b> )	-	Extracto DM	<b>Cha1-DM</b>
			Extracto Acuoso	<b>Cha1-AQ</b>
	Yucatán ( <b>Timucuy</b> )		Extracto DM	<b>Cha2-DM</b>
			Extracto Acuoso	<b>Cha2-AQ</b>

## 7.2 Rendimiento de los Extractos

**Extractos de DM.** Los rendimientos obtenidos para cada uno de los extractos se presentan en la Tabla 2. En las extracciones de **DM** se obtuvieron rendimientos por arriba del 10% lo que nos indica una buena cantidad de compuestos orgánicos extraídos, suficientes como para realizar las pruebas de actividad anti-*H. pylori*.

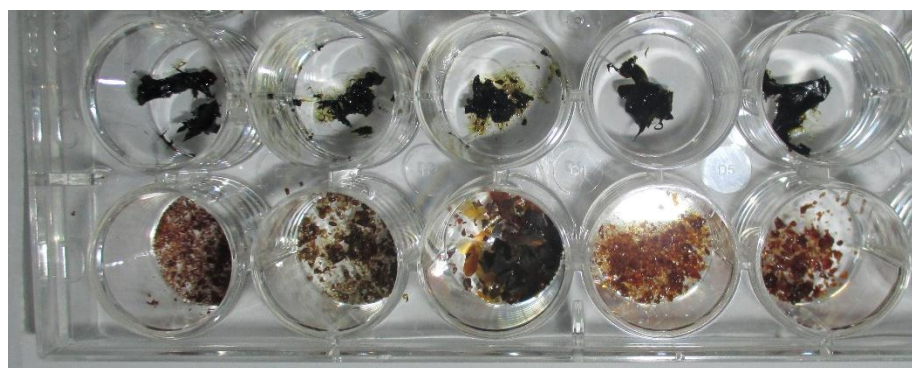
Los extractos obtenidos son de una coloración verde oscuro y consistencia pegajosa (Fig. 8).

Los rendimientos obtenidos para los dos extractos de chepil son similares, por lo que hasta este punto, no se observan diferencias en cuanto al origen de ambas plantas. Para el caso de los extractos **DM** de las dos muestras de chaya, se observa una pequeña diferencia en sus rendimientos, siendo mayor el de **Cha2-DM**, esto puede indicar que el contenido o concentración de compuestos orgánicos de distintas polaridades varía respecto a la región donde crece la chaya, se requeriría datos adicionales y otros análisis para afirmarlo.

**Tabla 2.** Rendimientos calculados para los extractos **DM** de las muestras de quelites

Extracto	Peso de material vegetal inicial (g)	Peso de extracto seco (g)	Rendimiento (%)
A1a-DM	50.00	6.86	13.71

<b>Extracto</b>	<b>Peso de material vegetal inicial (g)</b>	<b>Peso de extracto seco (g)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
CheS-DM	50.00	9.46	18.92
CheC-DM	50.00	9.28	18.55
Cha1-DM	7.08	0.78	11.15
Cha2-DM	8.00	1.13	14.16



**Figura 8.** Apariencia de los extractos obtenidos. Arriba: extractos **DM**, abajo: extractos **AQ**, de izquierda a derecha: **Ala**, **CheS**, **CheC**, **Cha1** y **Cha2**.

**Extractos acuosos (AQ).** En la Tabla 3, se presentan los rendimientos finales obtenidos para los extractos acuosos libres de mucílago de cada una de las especies de quelites.

En este caso los rendimientos más altos los presentan las muestras de chaya lo cual se puede deber a que es la especie que no presenta mucílago en su composición y por lo tanto hubo menor manejo de las muestras y pérdida de material.

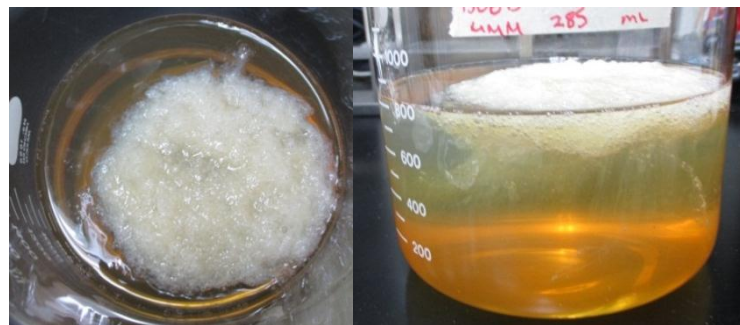
Los extractos secos tienen un color café-dorado y con apariencia de hojuelas. (Fig. 8).

**Tabla 3.** Rendimientos calculados para los extractos acuosos de las muestras de quelites

Extracto	Peso del material vegetal inicial (g)	Peso del extracto acuoso seco (g)	Peso del extracto seco y libre de mucílago (g)	Rendimiento del extracto final libre de mucílago* (%)
<b>Ala-AQ</b>	10.00	3.13	1.92	19.20
<b>CheS-AQ</b>	10.00	3.09	1.25	12.42
<b>CheC-AQ</b>	10.00	Nd	1.66	16.50
<b>Cha1-AQ</b>	5.53	1.58	-	28.61
<b>Cha2-AQ</b>	6.28	1.22	-	19.38

Nd. No determinado, \* Con respecto al material vegetal inicial.

**Mucilagos (MU).** Dos de las especies de quelites trabajadas (alaches y chepiles) tienen la particularidad de presentar un mucílago en su composición, los mucílago en general, son polisacáridos que forman parte de la fibra soluble presente en algunas plantas. Al ponerse en contacto con el agua crea una suspensión semi-gelatinosa que dificulta su disolución convencional en agua u otro solvente compatible con las bacterias. Por lo tanto, el extracto acuoso convencional no puede usarse para los ensayos de actividad anti-*H. pylori* en cultivo líquido. De tal manera, fue indispensable retirar el mucílago presente en el extracto acuoso mediante su precipitación con etanol (1:1) como se puede ver en la Fig. 9.



**Figura 9.** Precipitación del mucílago presente en **CheS-AQ**

En la Tabla 4 se presenta la abreviatura propuesta para las muestras de mucílago así como el rendimiento obtenido para cada uno de ellos.

**Tabla 4.** Rendimientos calculados para los mucilagos obtenidos a partir de tres muestras de quelites.

<b>Quelite de procedencia</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Peso seco (g)</b>	<b>Rendimiento sobre el material vegetal original (%)</b>
<b>Alache</b>	Ala-MU	0.607	6.06
<b>Chepil Silvestre</b>	CheS-MU	0.568	5.63
<b>Chepil Cultivado</b>	CheC-MU	0.612	6.08

En comparación con otras plantas comestibles, como la espinaca china (*B. alba*) o el nopal (*O. ficus-indica*), que poseen 9 y 4% de mucílago en su composición respectivamente (Vazquez, 2004; Ramu, 2011) la cantidad de mucílago en estos quelites es similar, por lo que el estudio de estas muestras es relevante para aportar información sobre la actividad biológica que pudiera estar presente en los quelites que lo poseen.

### *7.3 Manejo de alimentos preparados a partir de tres especies de quelites seleccionadas.*

Otro de los objetivos del presente trabajo es estudiar el potencial anti-*H. pylori* de alimentos tradicionales preparados con quelites, para darles un valor agregado al ser consumidos con frecuencia.

Para esto, el grupo interdisciplinario de trabajo al que pertenece el proyecto decidió que, con base al uso tradicional de los quelites en su región de origen, los alimentos que se prepararían serían: alaches en guisado caldoso, tamales de chepil y agua de chaya.

En el caso de las muestras de alimento de alache y chepil (**Ala-Alim** y **Che-Alim**), la naturaleza de los alimentos complicó las pruebas de inhibición de crecimiento y adherencia debido a que las muestras no son solubles en agua. De esta manera se decidió usar el alimento en polvo de manera directa en los



ensayos pues se consideró que el alimento debía estudiarse de la manera más similar posible a la forma tradicional en que se consume.

Los resultados obtenidos para estas muestras se reportan para concentraciones que no llegaron a disolverse por completo.

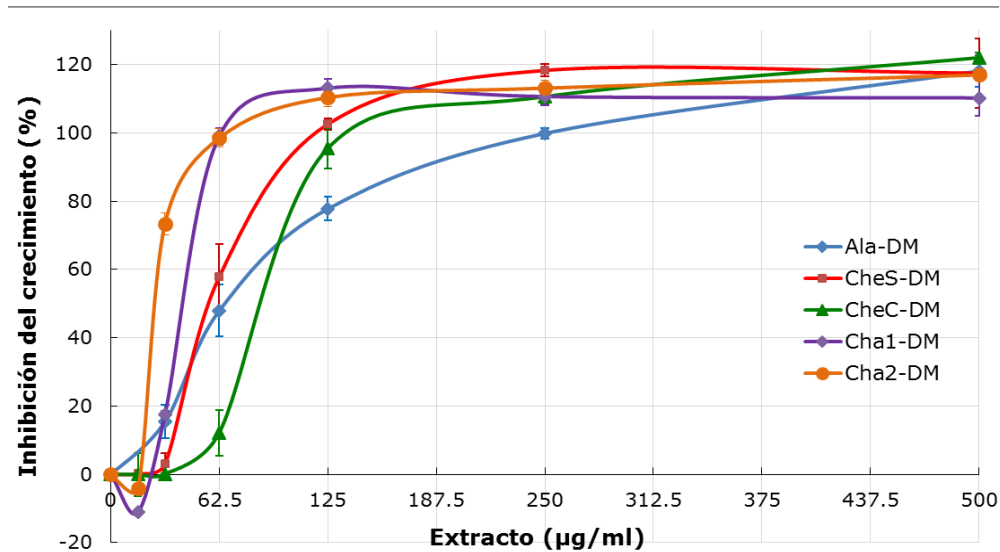
En el caso del alimento de chaya (**Cha-alim**) no hubo problema para su manejo debido a que la muestra de agua liofilizada es perfectamente soluble. Los resultados para las muestras se reportan en concentraciones totalmente solubles.

#### *7.4 Evaluación del potencial anti-Helicobacter pylori.*

**Extractos DM.** La Fig. 10, muestra el efecto de diferentes concentraciones de los extractos de **DM** de cada una de las especies de quelites, sobre el crecimiento de *H. pylori*. Todos los extractos son capaces de inhibir el crecimiento de la bacteria al 100%, pero a diferentes concentraciones. Los dos extractos de chaya (**Cha1-DM** y **Cha2-DM**) son los más efectivos pues logran el efecto inhibitorio total a una concentración de 62.5 µg/ml.

El efecto inhibitorio más bajo lo presenta **Ala-DM** pues se alcanza el 100% de inhibición a la concentración más alta probada (500 µg/ml), mientras que los extractos de las dos muestras de chepil logran inhibir el crecimiento en su totalidad a 125 y 250 µg/ml (**CheS-DM** y **CheC-DM**, respectivamente). En todos los casos se muestra un efecto dependiente de la concentración. Más adelante se discutirán los valores de CMI obtenidos para estos extractos.

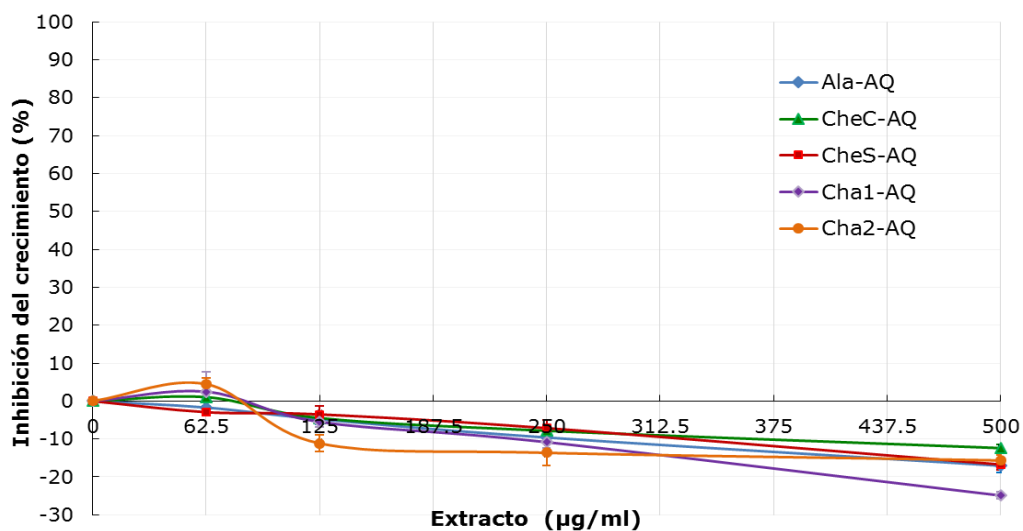
De acuerdo con estos resultados, los extractos **DM** de las tres especies de quelites tienen potencial para su estudio posterior en un fraccionamiento biodirigido para la purificación, aislamiento e identificación de los compuestos bioactivos.



**Figura 10.** Efecto de los extractos **DM** sobre el crecimiento de *H. pylori*. Los datos son presentados como la media  $\pm$  EEM. Cada punto representa el promedio de al menos tres experimentos independientes por triplicado.

En la gráfica se puede observar que todos los extractos presentan inhibiciones superiores al 100%, esto representa que hay menor absorbencia final que respecto a la del tiempo inicial en el cálculo del porcentaje de inhibición. Esto podría sugerir que los extractos pueden tener efecto bactericida en comparación con los controles positivos de inhibición (amoxicilina y metronidazol), cuyas gráficas se presentan en la página 45.

**Extractos AQ.** En la Fig. 11 se muestra el efecto sobre el crecimiento de *H. pylori* de los extractos acuosos obtenidos, a diferentes concentraciones.

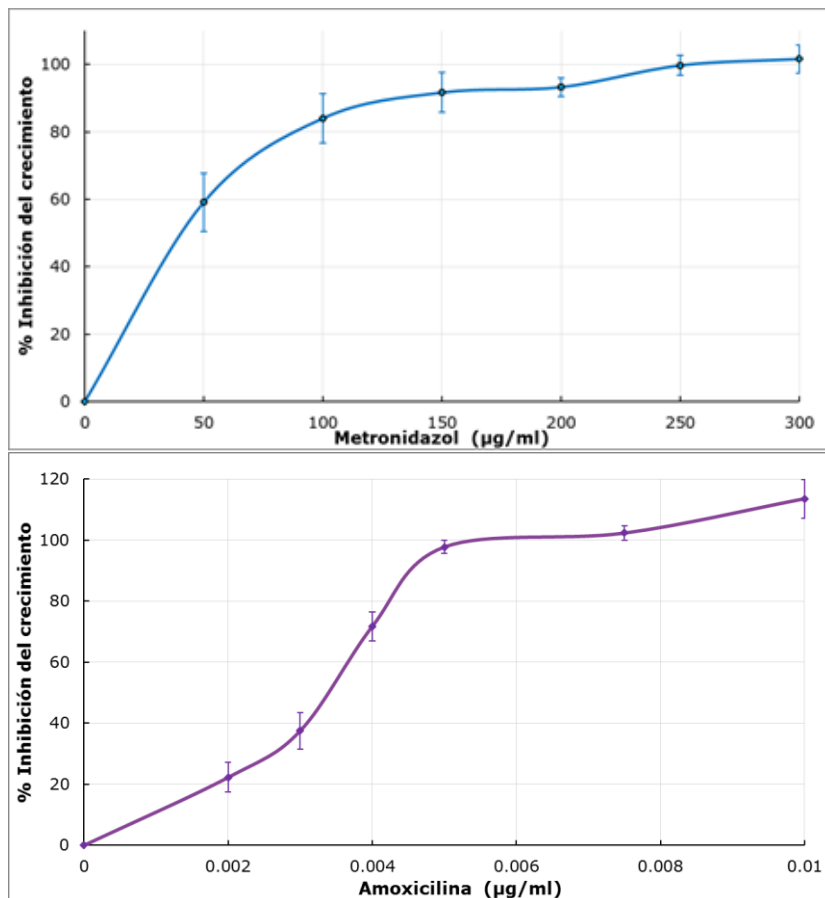


**Figura 11.** Efecto de los extractos **AQ** sobre el crecimiento de *H. pylori*. Los datos son presentados como la media  $\pm$  EEM. Cada punto representa el promedio de al menos tres experimentos independientes por triplicado.

Como se aprecia, los extractos acuosos en general no inhiben el crecimiento de la bacteria, incluso, a altas concentraciones favorecen ligeramente el crecimiento.

En el caso del alache, este resultado es congruente con lo que se obtuvo previamente por el grupo de trabajo donde se desarrolló esta estancia, que reportó que la actividad inhibitoria del extracto acuoso de dicha planta es nula. (Castillo-Juárez, *et al.*, 2009).

**Antibióticos de referencia.** Como controles positivos en la determinación del potencial anti-*H. pylori*, se utilizaron los antibióticos amoxicilina y metronidazol que se usan en la terapia contra la bacteria. Los resultados de las pruebas se reportan en la Fig. 12.



**Figura 12.** Efecto de los antibióticos de referencia sobre el crecimiento de *H. pylori*. Los datos son presentados como la media  $\pm$  EEM. Cada punto representa el promedio de al menos tres experimentos independientes por triplicado.

### **Determinación de las CMI's.**

La CMI se define como la concentración más baja de un compuesto o extracto, a la cual se inhibe el 100% del crecimiento de algún microorganismo. Este valor nos da indicativo de la potencia de un compuesto para inhibir el crecimiento, en este caso, de *H. pylori* y poder clasificar su actividad. Con base en la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los controles positivos de inhibición bacteriana, amoxicilina y metronidazol (CMI= 0.005 y 250 µg/ml respectivamente), se estableció la siguiente escala de actividad:

<b>Actividad</b>	Nula	Baja	Moderada	Buena	Alta
<b>CMI (µg/ml)</b>	>500	>300 - 500	>125 - 300	>15.63 - 125	≤15.63

Comparando los valores de CMI obtenidos para cada extracto con la escala, se clasificó la actividad de los mismos (Tabla 5).

**Tabla 5.** CMI's de las muestras evaluadas contra *H. pylori* y clasificación de su actividad.

<b>Quelite</b>	<b>Extracto o compuesto</b>	<b>Rendimiento (%)</b>	<b>CMI (µg/ml)</b>
Alache	Diclorometano-metanol <b>(Ala-DM)</b>	13.71	250.00
	Acuoso <b>(Ala-AQ)</b>	19.20	>500.00
Chaya	Diclorometano-metanol <b>(Cha1-DM)</b>	11.15	62.50
	Acuoso <b>(Cha1-AQ)</b>	28.61	>500.00
	Diclorometano-metanol <b>(Cha2-DM)</b>	14.16	62.50
	Acuoso <b>(Cha2-AQ)</b>	19.38	>500.00
Chepil	Diclorometano-metanol <b>(CheS-DM)</b>	18.92	125.00
	Acuoso <b>(CheS-AQ)</b>	12.42	>500.00
	Diclorometano-metanol <b>(CheC-DM)</b>	18.55	125.00
	Acuoso <b>(CheC-AQ)</b>	16.50	>500.00
<b>Controles positivos</b>	Amoxicilina	-	0.005
	Metronidazol	-	250.00

En éste resumen se puede ver que los extractos de **DM** en general, son más activos que los extractos acuosos, esto podría ser por la gran cantidad de compuestos orgánicos que se extraen en su espectro de polaridad. Al comparar las CMI's de los extractos de quelites con la del antibiótico de referencia amoxicilina, las CMI's obtenidas fueron mucho mayores, sin embargo, si las comparamos con el antibiótico metronidazol, todos los extractos de **DM** fueron mejores. De entre ellos, **Cha1-DM** y **Cha2-DM** son los extractos más activos (CMI= 62.5 µg/ml) con una actividad buena de acuerdo con la escala establecida.

Esta información es muy importante dado que el Metronidazol es uno de los antibióticos básicos en la terapia de erradicación de la cual tiene una tasa de éxito del 80% (Sierra *et al.*, 2013).

Hay que destacar que la bacteria presenta alta resistencia al metronidazol y otros antibióticos similares (Trespacios *et al.*, 2010) por lo que es importante encontrar compuestos con actividad similar que se consideren como nuevas alternativas a estas terapias. En este caso sería recomendable continuar con el estudio de los extractos con actividades buenas.

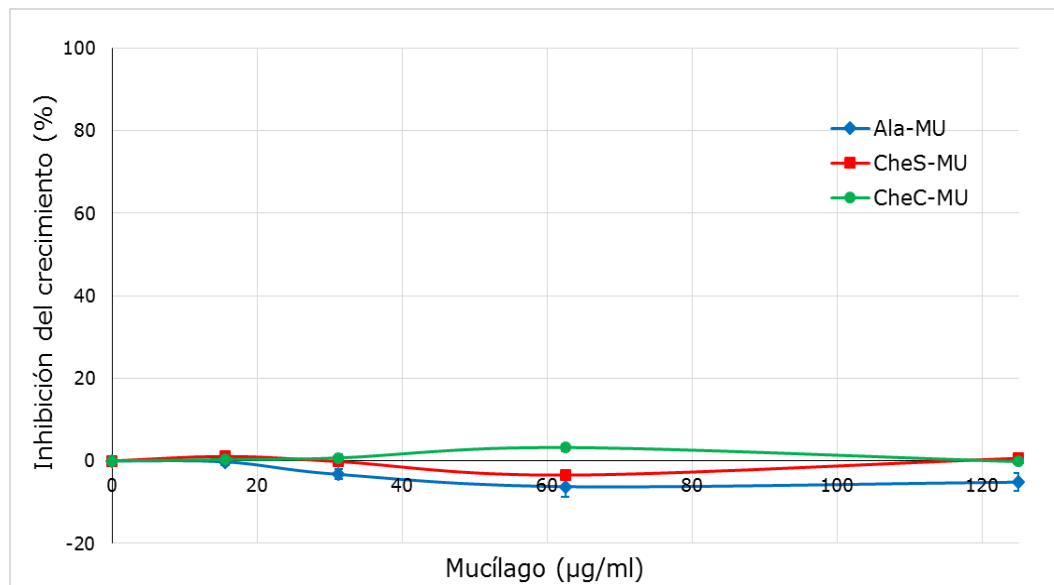
También se pueden observar CMI's iguales para extractos de una misma especie de quelite, esto podría indicar que no hay diferencia entre las distintas variedades del chepil (silvestre y cultivado) y por la procedencia de las muestras de chaya.

De acuerdo con la clasificación de la actividad anti-*H. pylori* de los extractos **DM** podemos decir que los extractos de chaya presenta una actividad buena contra la bacteria y sería importante continuar con su estudio. Los extractos de chepil y alache también presentan cierto potencial, con actividades de buenas y moderadas, respectivamente, con lo que se demuestra la hipótesis de que las especies estudiadas si presentan cierta actividad contra *H. pylori*.

Los extractos **AQ** de los tres quelites estudiados presentan una actividad nula contra *H. pylori*, esto podría deberse a la baja cantidad o concentración de

compuestos activos contra la bacteria en dicho extracto. Estos resultados concuerdan con otros estudios donde el extracto acuoso presenta la actividad anti-*H. pylori* más baja y hay mayor efecto inhibitorio en los extractos con menor polaridad (Escobedo-Hinojosa *et al.*, 2012; Espinosa-Rivero *et al.*, 2015)

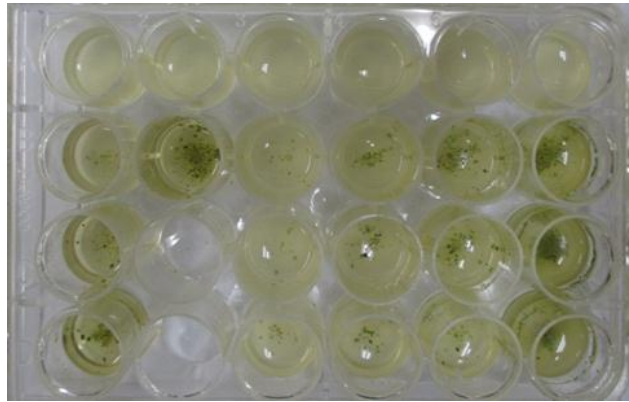
**Mucilagos (MU).** En el caso del mucílago obtenido del alache y chepil, encontramos que las muestras son insolubles en las condiciones del ensayo a concentraciones mayores de 125 µg/ml, por lo que ésta fue la concentración más alta empleada. En la Fig. 13 se muestra el efecto de cada mucílago sobre el crecimiento de la bacteria, en función de la concentración final probada. Como se observa, ninguno de los mucilagos tiene actividad anti-*H. pylori*. Se sabe que la composición general de los mucilagos consiste en polisacáridos de estructura similar a las de las pectinas, en el caso de estos quelites, no se tiene reportes de la caracterización de su mucílago pero no presentan compuestos activos contra la bacteria.



**Figura 13.** Determinación de la actividad anti-*H. pylori* de los mucílago (MU) de alache y chepil. Los datos son presentados como la media  $\pm$  EEM. Cada punto representa el promedio de al menos tres réplicas independientes por triplicado.

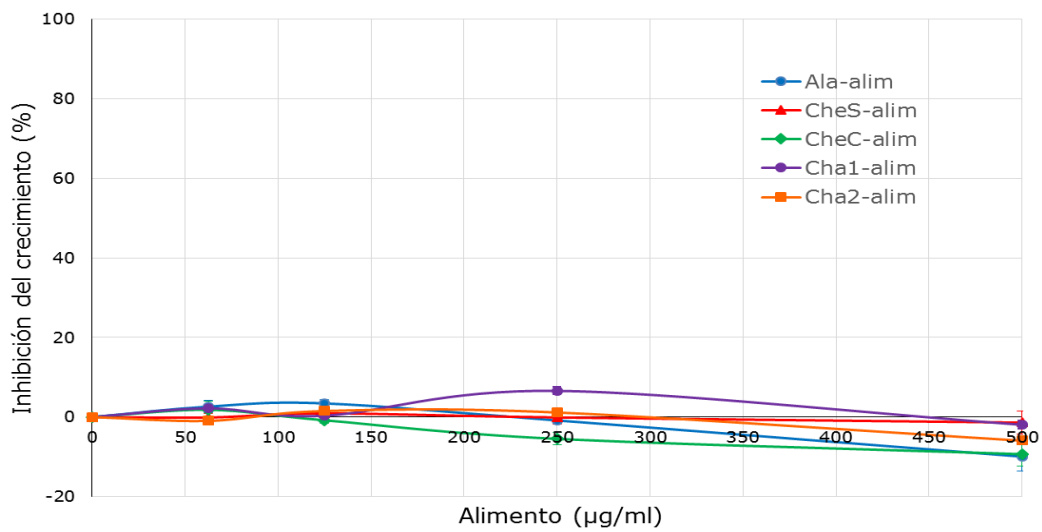
**Alimentos de quelites (alim).** En el caso del guisado de alache y el tamal de chepil, las muestras no son solubles (Fig. 14), por lo que se decidió añadirlos directamente al medio de cultivo. Es importante hacer notar que el ensayo se

realiza con agitación constante, e independientemente de la insolubilidad de la muestra, esto permite un contacto continuo de las bacterias con la muestra, lo que podría permitir que las moléculas tuvieran algún efecto sobre la bacteria. En el caso del agua de chaya, la metodología no se alteró gracias a la solubilidad total de la muestra.



**Figura 14.** Insolubilidad de **Ala-alim** en el ensayo de actividad anti-*H. pylori*

En la Fig. 15 se muestran los resultados obtenidos. En ningún caso se observó algún efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *H. pylori*. Esto puede deberse a que la metodología usada *in vitro* no es compatible con el tipo de muestras de los alimentos o que en el alimento no se encuentran compuestos bioactivos sobre la bacteria.



**Figura 15.** Determinación de la actividad anti-*H. pylori* de los alimentos (**alim**) de las especies de quelites seleccionadas. Cada punto representa el promedio de al menos tres réplicas independientes por triplicado  $\pm$ EEM.

En primer lugar, hay que hacer notar que debido a la forma en que se realizó el experimento, los datos obtenidos de cada experimento presentaron una gran dispersión, por lo que su análisis fue difícil.

Los resultados finales indicarían una nula acción de los alimentos contra *H. pylori* e incluso, en cantidades más altas se observa que se favorece ligeramente su crecimiento bajo las condiciones experimentales empleadas. Sin embargo, no es posible descartar algún efecto inhibitorio del alimento sobre la bacteria en condiciones dado que el ensayo no fue el ideal para determinar su acción.

De igual manera se evaluaron los condimentos y otros ingredientes presentes en el alimento tradicional (blancos) y se encontró que no ejercen algún efecto inhibitorio que detecte esta metodología (datos no mostrados).

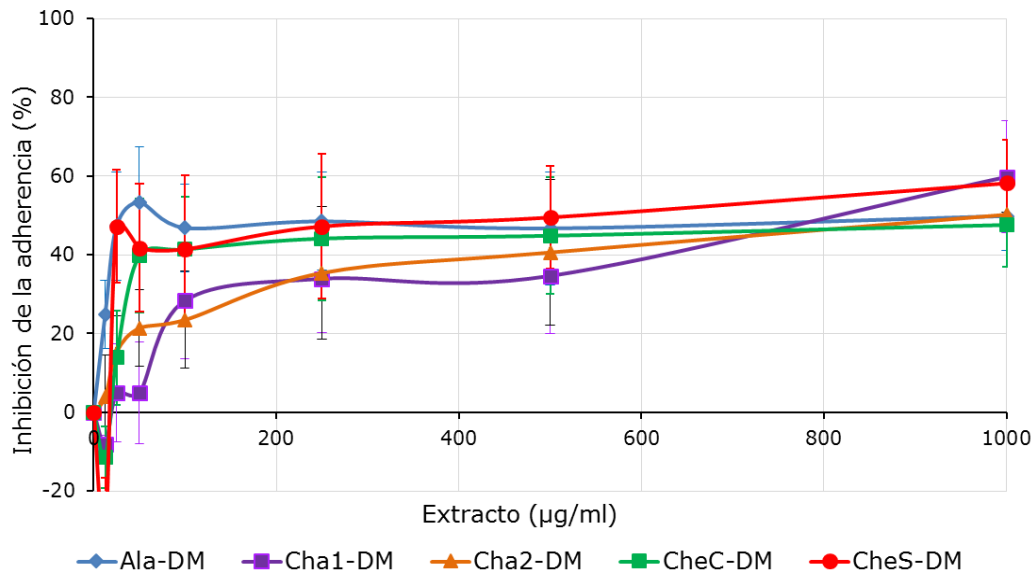
Para poder determinar correctamente el efecto que pueden presentar los platillos tradicionales se debe diseñar otro tipo de metodología, como los modelos animales, y determinar si el tratamiento térmico dado a los quelites en la preparación del alimento tienen algún efecto sobre la actividad original de los extractos.

### *7.5 Evaluación del efecto sobre la adherencia de H. pylori a células AGS*

Para que *H. pylori* pueda establecer una infección debe interactuar con las células del hospedero, de tener éxito puede colonizar y dañar el epitelio gástrico, por ello el incidir sobre este factor puede ser una de las vías por las que se puedan prevenir las enfermedades derivadas de la infección con la bacteria.

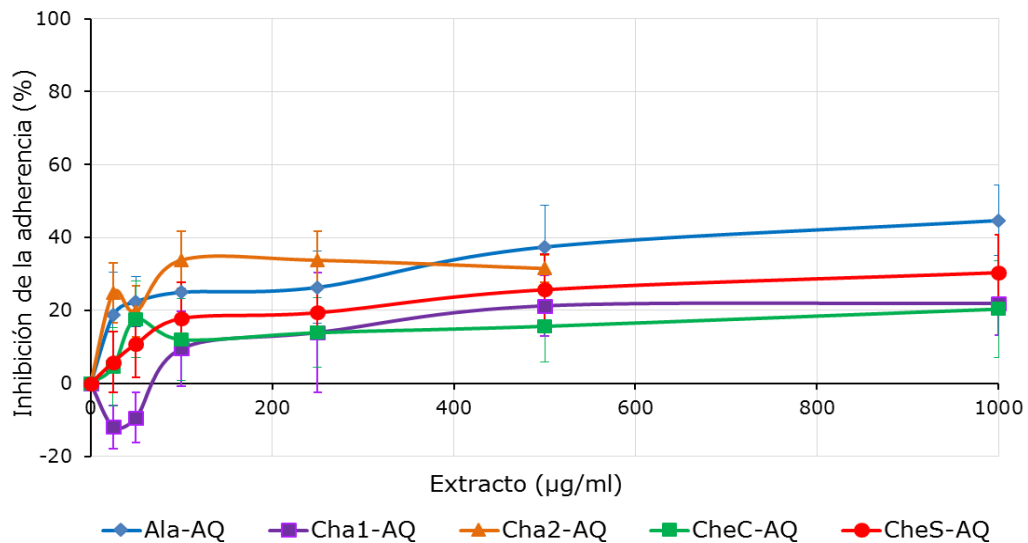
**Extractos DM.** En la Fig. 16 se observa el porcentaje de inhibición de la adherencia de *H. pylori* a células AGS en función de la concentración final probada para los extractos **DM**. Se observa un efecto inhibitorio de la adherencia de 50-60% y no presentan diferencia significativa entre ellos por lo que el efecto es bueno independientemente de la especie de quelite.





**Figura 16.** Determinación de la actividad anti-adherente de extractos **DM** de quelites. Cada punto representa el promedio de al menos tres experimentos independientes por cuadruplicado  $\pm$  EEM.

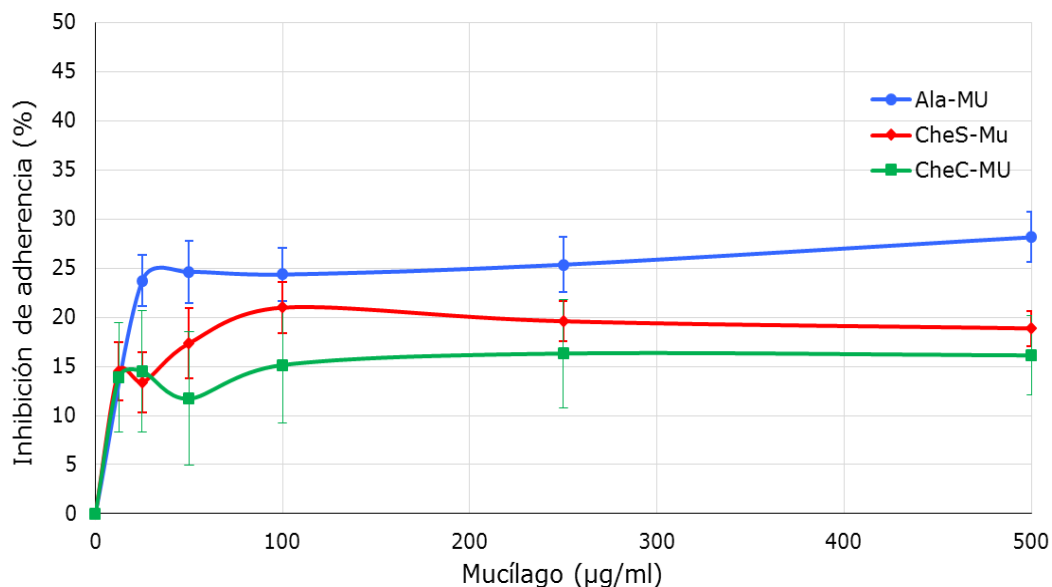
**Extractos AQ.** Para estos extractos observamos los resultados del ensayo de actividad anti-adherente en la Fig. 17. De manera general los extractos presentan una inhibición de 20-40% de la adherencia de *H. pylori* a células AGS. En este caso el efecto inhibitorio de **Ala-AQ** es mayor al del resto de los extractos del mismo tipo.



**Figura 17.** Determinación de la actividad anti-adherente de extractos **AQ** de quelites. Cada punto representa el promedio de al menos tres experimentos independientes por cuadruplicado  $\pm$  EEM.

En ambos casos se puede observar el efecto sobre la adherencia desde concentraciones bajas (en algunos casos incluso a 50  $\mu\text{g/ml}$ ), para los extractos **AQ**, el efecto de Ala-AQ es mayor al del resto de los extractos del mismo tipo por lo que esta especie podría considerarse con el mejor potencial al presentar más del 40% de inhibición de adherencia en los dos tipos de extractos.

**Mucilagos (MU).** Los resultados del ensayo para los mucilagos de alache y chepil se muestran en la Fig. 18, donde podemos ver que las tres muestras presentan un buen efecto inhibitor de la adherencia, destacándose el mucílago de alache, que alcanza un máximo de inhibición de la adherencia de  $28.13 \pm 2.54\%$ . También en este caso, las tres muestras presentan el efecto anti-adherente desde las concentraciones más bajas probadas, lo que nos indica la efectividad de los componentes de los mucílagos para bloquear el mecanismo de adherencia de *H. pylori* a células AGS.



**Figura 18.** Determinación de la actividad anti-adherente de mucílagos (**MU**) de quelites. Cada punto representa el promedio de al menos tres experimentos independientes por cuadruplicado  $\pm$  EEM.

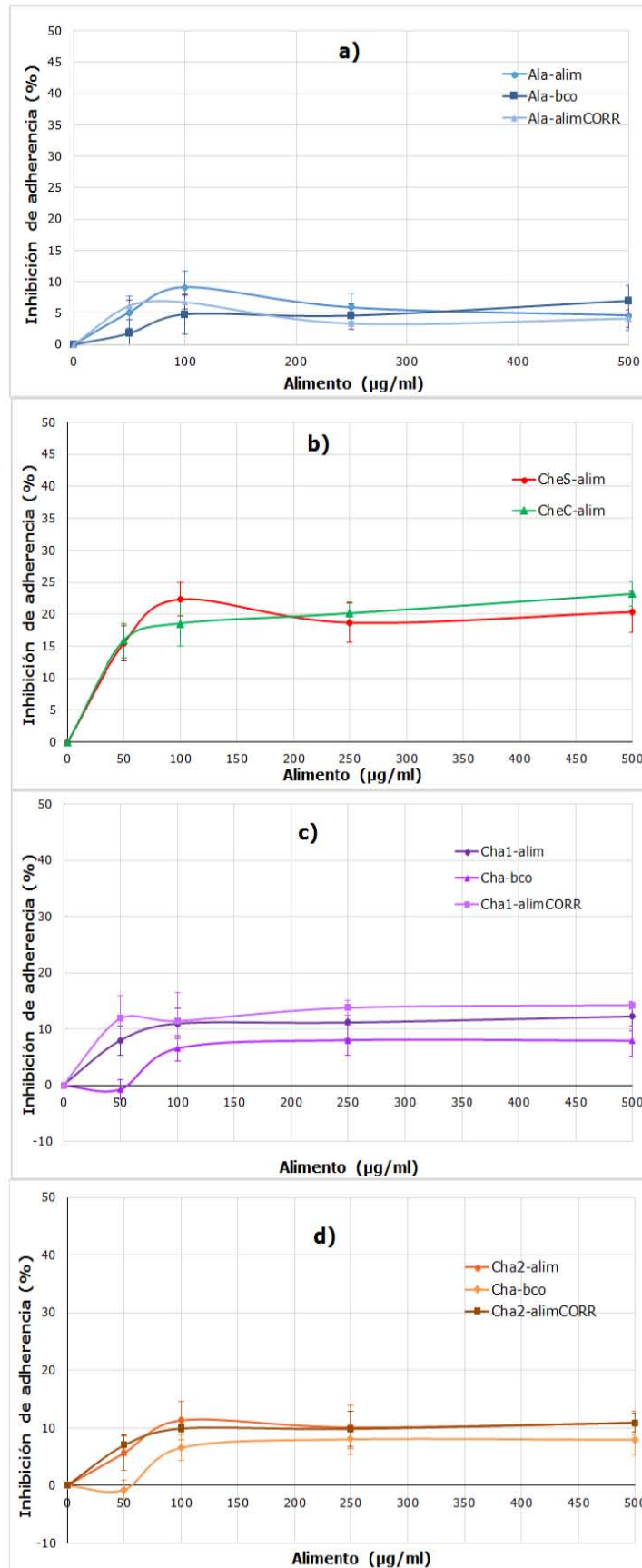
**Alimentos.** En la Fig. 19 se muestran los resultados obtenidos en la evaluación del efecto sobre la adherencia para los alimentos tradicionales ya descritos. En este caso, se muestran también los resultados de la evaluación de cada una de

las muestras consideradas como “blancos” para cada alimento, es decir, el resto de ingredientes presentes en el alimento, esto con el fin de descartar que la actividad observada se deba a los ingredientes y condimentos extra y no al efecto de cada especie de quelite por sí misma.

Para el caso del alache (Fig. 19a), el alimento presenta un efecto de inhibición de adherencia menor al 10% al igual que el efecto que presentan los condimentos por separado. Luego de la corrección de los datos ( $\% \text{ Inhibición de adherencia del alimento} - \% \text{ Inhibición de adherencia del blanco de condimentos}$ ), se encontró que la actividad anti-adherente del alache en el alimento preparado es de  $6.73 \pm 1.06\%$  a una concentración de  $100 \mu\text{g/ml}$ .

Los resultados de la evaluación de la actividad del alimento preparado con las dos muestras con chepil (Fig. 19b) indican que en ambos casos hay actividad inhibitoria de 20% aproximadamente a la concentración final más alta probada. En este caso también se observó que el efecto inhibitorio está presente desde concentraciones bajas ( $15\%$  a  $50 \mu\text{g/ml}$  para ambas muestras).

El efecto observado para los alimentos de chaya (Fig. 19c y d) es similar en ambas muestras que al corregirse con el efecto de las muestras “blanco” respectivas, se mantiene en un valor cercano al 10% de inhibición de la adherencia y que es independiente de la concentración final del alimento en el ensayo.



**Figura 19.** Determinación de la actividad anti-adherente de alimentos (**alim**) de quelites. **bco**: “blancos” para cada alimento. **alimCORR**: indica la curva obtenida de restar **Quelite-**

**alim – quelite-bco.** Cada punto representa el promedio de al menos tres experimentos independientes por cuadruplicado  $\pm$  EEM.

La adherencia de *H. pylori* a células epiteliales esta mediada por adhesinas, de las cuales se tienen reportadas alrededor de 40 (Testerman, *et al.*, 2001), por lo cual la diversidad de interacciones que existen entre las adhesinas de *H. pylori* y los receptores del huésped hacen poco probable que un solo compuesto o extracto logre inhibir el 100% de la inhibición de la bacteria.

Se han reportado actividades anti-adherentes de productos naturales, pero siempre se ha encontrado una inhibición parcial, por ejemplo, el extracto de té verde (*Camellia sinensis*) inhibió un 60% la adherencia de *H. pylori* a una concentración de 2 mg/ml (Lee *et al.*, 2009), el extracto acuoso de *Lippia integrifolia* (incayuyo) inhibe el 40% de la adherencia de *H. pylori* (Marcial *et al.*, 2014) y las fracciones de polisacáridos obtenidas de las especies *Artemisa capillaris* y *Panax ginseng*, inhibieron 44% y 66% respectivamente (Lee *et al.*, 2004).

Por otro lado Espinosa-Rivero reportó en 2016 como controles positivos de inhibición de adherencia al ácido siálico y a la fucosa. El primero actúa como inhibidor de la interacción de la adhesina SabA al residuo de ácido siálico y el segundo como a inhibidor de la interacción de la adhesina BabA a residuos de fucosa (Walz, *et al.*, 2005; Liu, *et al.*, 2009). Para ambos compuestos obtuvo un 25% de inhibición máxima de la adherencia a una concentración de 500  $\mu$ g/ml.

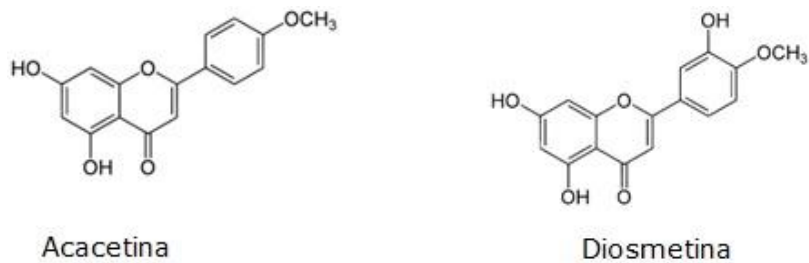
Con estos antecedentes, los resultados obtenidos por los extractos, alimentos y el mucílago de los quelites estudiados, nos indican una adherencia parcial buena que demuestra que estas especies tienen efecto sobre uno de los factores de colonización de *H. pylori* y podrían ayudar a la prevención de la infección y enfermedades asociadas a esta bacteria.

#### Flavonoides de interés presentes en el alache (*Anoda cristata*)

De manera adicional a los objetivos planteados en este trabajo y dado que Juárez-Reyes y colaboradores (2015) reportaron la presencia de dos

flavonoides, diosmetina y la acacetina (Fig. 20) en el alache, se decidió evaluar el potencial anti-*H. pylori* de estos compuestos puros para determinar si eran los responsables de las actividades encontradas previamente en los extractos.

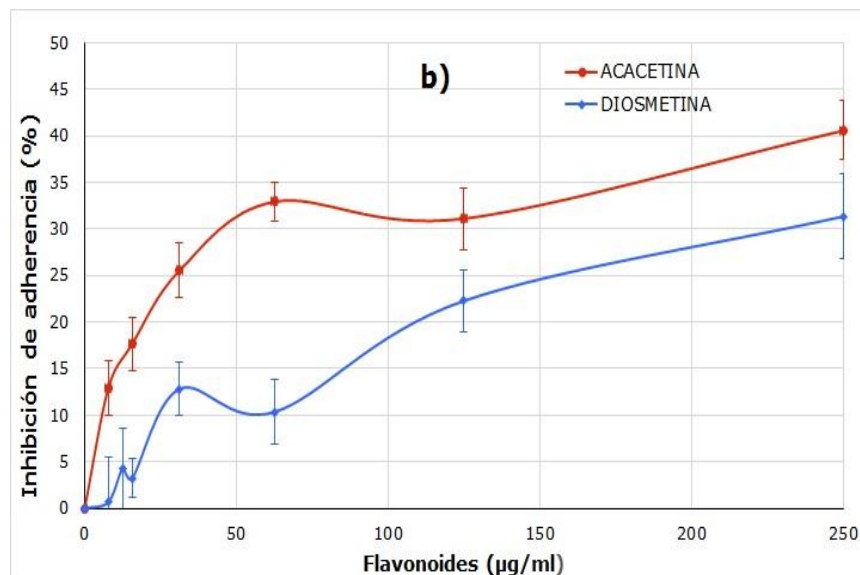
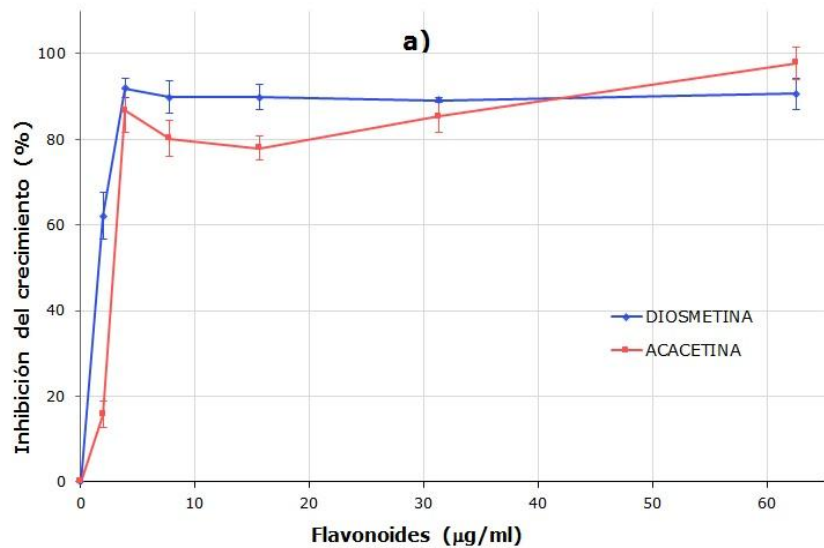
Los flavonoides son una familia de compuestos presentes en una gran variedad de plantas, muchas de ellas de uso tradicional y se sabe que algunos de ellos tienen actividad contra *H. pylori* y sus factores de colonización (Wang, 2014).



**Figura 20.** Estructura de los flavonoides estudiados: acacetina y diosmetina

La acacetina y la diosmetina se disolvieron en DMSO a concentraciones finales para de 1.95, 3.91, 7.82, 15.63, 31.25 y 62.5  $\mu\text{g/ml}$  para el ensayo de crecimiento y concentraciones finales de 1.95, 3.91, 7.82, 15.63, 31.25, 62.5, 125 y 250  $\mu\text{g/ml}$  para el ensayo de adherencia.

En la Fig. 21 se muestran los resultados de la evaluación del efecto de acacetina y diosmetina sobre el crecimiento y la adherencia de *H. pylori*, que se realizó con la metodología descrita para cada ensayo *in vitro*.

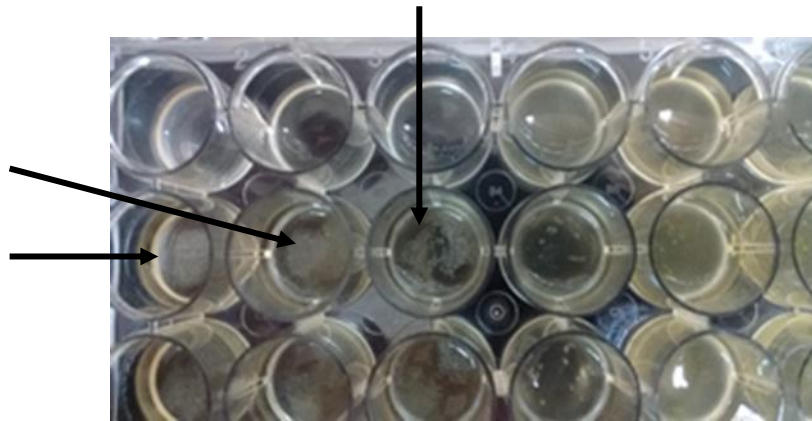


**Figura 21.** Efecto de los flavonoides del alache, sobre **a)** el crecimiento y **b)** adherencia de *H. pylori*. Los datos son presentados como la media  $\pm$  EEM. Cada punto representa el promedio de al menos tres experimentos independientes por triplicado.

En el caso de la actividad anti-*H. pylori*, se encontró que para ambos flavonoides el porcentaje de inhibición de adherencia es de alrededor de 90% a la concentración más alta probada (62.5 µg/ml). No se evaluaron concentraciones más altas debido a la insolubilidad de los compuestos en el medio de cultivo usado en la prueba (Fig. 22), sin embargo, a una concentración final de 3.9 µg/ml se encontró una inhibición de  $86.70 \pm 5.05\%$

para la acacetina y de  $91.94 \pm 2.16\%$  para la diosmetina, lo que nos indica un fuerte efecto contra *H. pylori* y una saturación en el efecto sobre la bacteria desde concentraciones bajas.

Previamente, se había reportado una MIC  $>100 \mu\text{g/ml}$  para la diosmetina determinado mediante el método de difusión en agar (Bae *et al.*, 1999). En el caso del presente trabajo se usó una metodología que permite que el compuesto diluido este en contacto directo constante con la bacteria y a diferencia del reporte mencionado, se encontró un valor de inhibición de crecimiento alto y preciso a una concentración más baja de la reportada previamente.



**Figura 22.** Insolubilidad de flavonoides en el ensayo de actividad anti-*H. pylori* a concentraciones mayores a  $62.5 \mu\text{g/ml}$ .

Los resultados de la prueba de adherencia (Fig. 21 b) indican que ambos flavonoides inhiben la adherencia de *H. pylori* a células AGS. Para la acacetina, se encontró una mejor actividad respecto a la diosmetina, que a una concentración final de  $250 \mu\text{g/ml}$  logran una inhibición de la adherencia de  $40.56 \pm 3.16\%$  y  $31.35 \pm 4.61\%$ , respectivamente. Las actividades encontradas para estos compuestos son buenas y nos indican que los flavonoides presentes en el alache podrían ser los responsables de la actividad anti-*H. pylori* que se encontró en los extractos.

La presencia de estos dos flavonoides en el alache podría presentar algún efecto contra *H. pylori* al consumirse la planta entera como se hace de manera tradicional aunque es necesario demostrar la presencia y concentración de los



flavonoides en dicho alimento y si sería suficiente para seguir presentando el efecto que se encontró en este trabajo.

Por otro lado, podemos decir que la acacetina y la diosmetina, son compuestos que pueden incidir en el control de *H. pylori* pues tienen efecto inhibitor sobre su crecimiento y su adherencia a células del epitelio, por lo que se debería continuar con su estudio para poder usarlos como una posible alternativa o complemento a los tratamientos tradicionales usados contra *H. pylori* y las enfermedades asociadas a su infección.

## VIII. Conclusiones

Los extractos de diclorometano-metanol de las tres especies de quelites, presentan actividades anti-*H. pylori* de buenas a moderadas en relación con los antibióticos de referencia. No se presenta diferencia en la actividad de los extractos **DM** de la misma especie de quelite.

Particularmente, los extractos **DM** de las dos muestras de chaya procedentes de Yucatán, presentaron una CMI menor al resto de los extractos lo que indica una mejor actividad contra la bacteria.

Estos mismos extractos presentan un buen efecto inhibitorio de la adherencia de *H. pylori* a células AGS, sin mostrar diferencia entre las especies de quelites estudiadas.

Por otro lado los extractos acuosos de las tres especies de quelites, presentan una actividad nula contra *H. pylori*, sin embargo, tienen actividad inhibitoria de la adherencia de la bacteria, que puede ser comparable con compuestos que han sido probados como controles positivos de inhibición.

Los mucílagos obtenidos del alache y de ambas variedades de chepil usadas en este trabajo, no presentaron efecto anti-*H. pylori*, pero si tienen actividad contra la adherencia de ésta a células AGS. El mucilago del alache alcanzó una inhibición de la adherencia superior a 25%, lo que representa una buena efectividad y potencial para ser estudiado como inhibidor de la infección por *H. pylori*.

La metodología empleada para determinar el potencial anti-*H. pylori* de los alimentos preparados a partir de los quelites seleccionados no permitió la completa solubilidad de las muestras de alimento de alache y chepil, que no arrojó resultados favorables pues no se observa efecto inhibitorio contra *H. pylori*. En el caso del alimento de chaya, totalmente soluble en el ensayo, no presentó actividad contra la bacteria.

En el caso del ensayo de adherencia se presentó el mismo problema de solubilidad con las muestras de alimento de alache y chepil, sin embargo, este último presentó un 20% de inhibición de adherencia (para ambas variedades), por lo que es probable que los alimentos preparados con este quelite tengan este efecto sobre la bacteria.

Para determinar con claridad el efecto de los alimentos sobre el crecimiento de *H. pylori* y su adherencia a las células del epitelio, se propone buscar otras metodologías.

Se encontró que los dos flavonoides estudiados del alache presentan una buena actividad anti-*H. pylori*, pues a pesar de que no se logró determinar una CMI, ambos compuestos alcanzan cerca del 90% de inhibición del crecimiento a una baja concentración (3.9 µg/ml). Ambos flavonoides también presentaron actividad anti-adherente, destacándose la acacetina con un máximo de inhibición del 40% a la concentración final más alta probada en el ensayo.

En general, las actividades de extractos **DM** y compuestos que se pudieron determinar, son similares o incluso mejores que la del metronidazol, antibiótico de referencia utilizado como tratamiento contra *H. pylori* y otras enfermedades. Por esto, se puede decir que las especies de quelites estudiadas si presentan en su composición, sustancias activas que podrían ser de ayuda en la prevención de infección con *H. pylori* y de las patologías ligadas a su presencia.

Este trabajo representa el primer estudio dirigido de la actividad anti *H. pylori* de quelites consumidos de manera tradicional en la dieta mexicana.

## IX. Perspectivas

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, se plantean las siguientes perspectivas:

- Un fraccionamiento biodirigido de los extractos con actividad sobre *H. pylori* con la finalidad de obtener compuestos puros que puedan ser empleados como fármacos contra la bacteria.
- Estudiar la toxicidad de los extractos obtenidos.
- Caracterizar fitoquímicamente a los extractos de las tres especies de quelites en estudio para identificar los compuestos responsables de las propiedades atribuidas a ellos.
- Evaluar el efecto de un tratamiento térmico a los quelites, como modelo de procesamiento tradicional, sobre la actividad que presentan los extractos contra la bacteria *H. pylori*.
- Se propone buscar una metodología que permita estudiar el efecto de los alimentos tradicionales elaborados a partir de quelites, sobre *H. pylori*. Se sugiere la utilización de modelos animales infectados con la bacteria, que sean alimentados con los quelites para evaluar su efecto. También se podría procesar las muestras de alimento con condiciones enzimáticas similares a las del estómago en experimentos in vitro en presencia de *H. pylori*.

## X. Bibliografía

Aggarwal, B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R., Seeram, N., Shishodia, S. y Takada, Y. 2004. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Research*. 24, 2783-2840.

Altieri M. y Nicholls C. 2010. Agroecología: Potenciando la agricultura campesina para revertir el hambre y la inseguridad alimentaria en el mundo. *Revista Económica Crítica*. 10, 62-74.

Arellano J., Caballero J. y Mapes C. 1984. Plantas comestibles del Sureste de México. Resúmenes del IX Congreso Mexicano de Botánica. Sociedad Botánica de México.

Argueta, A., Cano, L. y Rodarte, M. (coord.) 1994. Atlas de las plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Tomo I, II y III. Instituto Nacional Indigenista. México.

Aspholm, M., Olfat, F., Nordén, J., Sondén, B., Lundberg, C., Sjöström, R., Altraja, S., Odenbreit, S., Haas, R., Wadström, T., Engstrand, L., Semino-Mora, C., Liu, H., Dubois, A., Teneberg, S., Arnqvist, A. y Borén, T. 2006. SabA Is the *H. pylori* Hemagglutinin and Is Polymorphic in Binding to Sialylated Glycans. *PLoS Pathogenes*. 2, 110.

Atherton, J. 2006. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastroduodenal diseases. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 1, 63-96.

Ayala-Alcántara, F. 2016. Perfil sensorial de Especies Tradicionales Subvaloradas y Subutilizadas de México: Quelites. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

Bae, E., Han, M. y Kim, D. 1999. *In vitro* Anti-*Helicobacter pylori* Activity of Some Flavonoids and Their Metabolites. *Planta Médica*. 65, 442-443.

Bautista-Cruz, A., Arnaud-Viñas, M. R., Martínez-Gutiérrez, G., Sánchez-Medina, P. y Pérez-Pacheco R. 2011. The traditional medicinal and food uses of four plants in Oaxaca, México. *Journal of Medicinal Plants*. 5, 3404-3411.

Bizzozero G. 1893. Ueber die schlauchformigen drusen des magendarmkanals und die beziehungungen ihres epithels zu dem oberflachenepithel der schleimhaut. *Archiv für mikroskopische Anatomie*. 42, 82.

Blaser, M. y Atherton, J. 2004. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *Journal of Clinical Investigation*. 113, 321-333.

Bourges, H. y Vargas, L. A. 2015. *La cocina tradicional y la salud*. *Revista Digital Universitaria*. 16 [En línea]

Disponible en: <http://www.revista.unam.mx/vol.16/num5/art36/> [Último acceso el 5 de Mayo de 2016]

Bourges, H. 2008. Los alimentos, la dieta y la alimentación. En: CASANUEVA Esther, Martha Kaufer Horwitz, Ana Bertha Pérez Lizaur, Pedro Arroyo (eds.), *Nutriología Médica*, tercera edición, México, D.F. Editorial Médica Panamericana. 597-662.

Bye, R. 1981. Quelites- ethnoecology of edible greens- past, present and future. *Journal of ethnobiology*. 1, 109-123.

Bye, R. y E. Linares. 2000. *Los quelites, plantas comestibles de México: una reflexión sobre intercambio cultural*. CONABIO. *Biodiversitas* 31, 11-14 [En línea] (actualizado al 2000).

Disponible en:

<http://www.biodiversidad.gob.mx/Biodiversitas/Articulos/biodiv31art3.pdf>

[Último acceso el 17 de noviembre de 2015]

Caballero, S.L. 1984. Plantas comestibles de la sierra norte de Puebla por totonacas y nahuas: Tuzamapan de Galeana y Santiago Yancuictlalpan, Pue. Tesis de Licenciatura (Biología). ENEP, Iztacala, UNAM.

- 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.
- Castillo-Juárez, I. y Romero, I. 2007. Plantas con actividad anti-*Helicobacter pylori*: una revisión. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 80, 35-61.
- Cassel-Beraud, A., Le, J., Mouden, J. C., Adriantsoa, M. y Adriantsiferana, R. 1991. Preliminary study of the prevalence of *Helicobacter pylori* in Tananarive, Madagascar and the antibacterial activity *in vitro* of 13 Malagasy medicinal plants on this germ. *Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar*. 59, 9-23.
- Cervantes-García, E. 2016. *Helicobacter pylori*: mecanismos de patogenicidad. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*. 63, 100-109.
- Chaturvedi, S., Sharma, P., Kumar, V. y Bansal, M. 2011. Role of Nutraceuticals in health promotion. *International Journal of Pharm Tech Research*. 3, 442-448.
- Collins, J., Ali-Ibrahim, A. y Smoot D. 2006. Antibiotic therapy for *Helicobacter pylori*. *The Medical Clinics of North America*. 90, 1125-1140.
- Denova-Gutiérrez, E., Hernández-Ramírez, R., López-Carrillo, L., 2014. Dietary patterns and gastric cancer risk in Mexico. *Nutrition and cancer*. 66, 369-376.
- Diplock, A., Aggett, P., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E. y Roberfroid, M. 1999. Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *British Journal of Nutrition*. 81, S1–S28.
- Dixon, M. 2001. Pathology of Gastritis and Peptic Ulceration. En: *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. Eds. Mobley, H., Mendz, G. y Hazell, S. ASM Press, Washington. 459-469.

Eaton, K., Suerbaum, S., Josenhans, C. y Krakowka, S. 1996. Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infection and Immunity*. 64, 2445-2448.

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

Espinosa-Rivero, J., Rendón-Huerta, E., Romero, I. 2015. Inhibition of *Helicobacter pylori* growth and its colonization factors by *Parthenium hysterophorus* extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 174, 253-260.

Espinosa-Rivero, J. 2016. Efecto de extractos y compuestos de *Parthenium hysterophorus* sobre *Helicobacter pylori* y sobre algunos mecanismos de colonización. Tesis de Doctorado. Doctorado en Ciencias Biomédicas. UNAM.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, S., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D. y Bray, F., 2014. Cancer incidence and mortality worldwide. International Agency for Research on Cancer. [En línea]

Disponible en: <http://globocan.iarc.fr>. [Ultimo acceso el 18 de Abril de 2016]

Gálvez, A. y Bourges, H. 2012. La alimentación en la ciudad de México. En: Los riesgos para la salud en la vida de una megametrópolis. Memoria I. México, UNAM, Facultad de Medicina, Seminario sobre Medicina y Salud. 366-403

García-Rodríguez, R., Gutiérrez-Rebolledo, G., Méndez-Bolaina E., Sánchez-Medina, A., Maldonado-Saavedra, O., Domínguez-Ortiz, M., Vázquez-Hernández, M., Muñoz-Muñiz, O. y Cruz-Sánchez J. 2014. *Cnidocolus chayamansa* Mc Vaugh, an important antioxidant, anti-inflammatory and cardioprotective plant used in Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*. 151, 937-43.

García-Torres, J. 2015. Estudio del nivel de agrado y preferencia de quelites (*Amaranthus hypochondriacus*, *Chenopodium berlandieri*, *Cnidocolus aconitifolius*, *Portulaca oleracea*, *Rorippa nasturtium-aquaticum*, *Anoda cristata*,



*Crotalaria longirostrata*, *Cylanthera langaei*) en consumidores habituales de las zonas de Morelos, Oaxaca y Chiapas. Reporte de Estancia Estudiantil. Facultad de Química, UNAM.

Goodwin, C., Armstrong, J., Chilvers, T., Peters, M., Collins, M., Sly, L., McConnell, W. y Harper W. (1989) Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov. Respectively. International Journal of Systematic Bacteriology. 39, 397-405.

Goodwin, C. y Armstrong, J. 1990. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 9, 1-13.

IARC (International Agency of Research on Cancer). 1994. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk on humans. Lyon. WHO. 61, 177-240.

Jarvis, D. 2007. C. Padoch, D. Cooper (eds). Managing Biodiversity in Agricultural Exosystems, New York, Columbia University Press. 492 pp.

Jiménez-Aguilar, D. y Grusak, M. 2015. Evaluation of Minerals, Phytochemical Compounds and Antioxidant Activity of Mexican, Central American, and African Green Leafy Vegetables. Plant Foods for Human Nutrition. 70 , 357-64.

Juárez-Reyes, K., Brindis, F., Medina-Campos, O., Pedraza-Chaverri, J., Bye, R., Linares, E. y Mata, R. 2015. Hypoglycemic, antihyperglycemic, and antioxidant effects of the edible plant *Anoda cristata*. Journal of Ethnopharmacology. 161, 36-45.

Jones, K., Joo, Y., Jang, S., Yoo, Y., Lee, S., Chung, I. y Olsen, C. H. 2009. Polymorphism in CagA EPIYA motif impacts development of gastric cancer. Journal of Clinical Microbiology. 47, 959-968.

Kaisoon, O., Siriamornpun, S., Weerapreeyakul, N. y Meeso, N. 2011. Phenolic compounds and antioxidant activities of edible flowers from Thailand. Journal of Functional Foods. 3, 88-99.

Kao, C., Sheu, B. y Wu, J. 2016. *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomedical Journal*. 39, 14-23.

Kuster, J., van Vliet, A. y Kuipers, E. 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori*. *Clinical Microbiology Reviews*. 19, 449-490.

Kuti, J. y Konuru, H. 2004. Antioxidant capacity and phenolic content in leaf extracts of tree spinach (*Cnidocolus* spp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 117-21.

Kuti, J. y Kuti, H. 1999. Proximate composition and mineral content of two edible species of *Cnidocolus* (tree spinach). *Plant Foods for Human Nutrition*. 53, 275-83.

Lazcarro, I. INAH Morelos, Centro de Información y Documentación. Difusión. 2013. El sistema milpa: laboratorio de biodiversidad, lugar de batallas cósmicas. [En línea] (actualizado al 30 de junio de 2013)

Disponible en: <http://hool.inah.gob.mx:1127/jspui/handle/123456789/242> [Último acceso el 20 de noviembre de 2015]

Lee, A., Dixon, M., Danon, S., Kuipers, E., Megraud, F., Larsson, H. y Mellgard, B. 1995. Local acid production and *Helicobacter pylori*: a unifying hypothesis of gastroduodenal disease. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 7, 461-465.

Lee, J., Park, E., Uhm, C., Chung, M. y Kim, K. 2004. Inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric adenocarcinoma epithelial cells by acidic polysaccharides from *Artemisa capillaris* and *Panax ginseng*. *Planta Medica*. 70, 615-619.

Lee, J., Shim, J., Chung, M., Lim, S. y Kim, K. 2009. *In vitro* anti-adhesive activity of green tea extract against pathogen adhesion. *Phytotherapy Research*. 23, 460-466.

Linares, E. y Aguirre, J. (eds.) 1992. Los quelites, un tesoro culinario. Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México y el Instituto Nacional de la Nutrición *Salvador Zubirán*. México, D.F.

Linares, E. y Bye, R. 2015. Las especies subutilizadas de la milpa. *Revista Digital Universitaria*. 16 [En línea]

Disponible en: <http://www.revista.unam.mx/vol.16/num5/art35/> [Último acceso el 22 de noviembre de 2015]

Liu, T., Ho, C., Huang, H., Chang, S., Popat, S., Wang, Y., Wu, M., Chen, Y. y Lin, C. 2009. Role for alpha-L-fucosidase in the control of *Helicobacter pylori*-infected gastric cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106, 14581-14586.

Logan, R. P. y Walker, M. 2001. ABC of the upper gastrointestinal tract: Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *British Medical Journal*. 323 (7318), 920-922.

Madigan, M.T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H. y Stahl, D. A. 2015. *Brock biology of microorganisms*. 14ª edición. Pearson. EUA. 1006.

Mahady, G., Pendland, S. y Chadwick, L. 2003. Resveratrol and red wine extracts inhibit the growth of CagA+ strains of *Helicobacter pylori* in vitro. *American Journal of Gastroenterology*. 98, 1440-1441.

Malaty, H. y Graham, D. 1994. Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut*. 35, 742-745.

Marcial, G., Sendker, J., Brandt, S., Perotti, M., Catalán, C., Font, G. y Hensel, A. 2014. Gastroprotection as an example: Antiadhesion against *Helicobacter pylori*, anti-inflammatory and antioxidant activities of aqueous extracts from the aerial parts of *Lippia integrifolia* Hieron. *Journal of Ethnopharmacology*. 155 (2), 1125-1133.

Marshall, B. y Warren, J. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*. 16, 1311-1315.

Miranda-Velasquez, L., Oranday-Cardenas, A., Lozano-Garza, H., Rivas-Morales, C., Chamorro-Cevallos, G. y Cruz-Vega, E. 2010. Hypocholesterolemic activity from the leaf extracts of *Cnidocolus chayamansa*. *Plant Foods for Human Nutrition*. 65, 392-5.

Molhar, A., Ley, C., Guarner, J., Herrera-Goepfert, R., Sanchez, L., Halperin, D. y Personnet, J. 2002. Alta frecuencia de lesiones precursoras de cáncer gástrico asociadas a *Helicobacter pylori* y respuesta al tratamiento en Chiapas, México. *Gaceta Médica de México*. 138, 405-410.

Morales De León, J., Bourges, H. y Vázquez-Mata, N. 2013. La composición nutrimental de los quelites. *Cuadernos de nutrición*. 36, 26-30.

Morton, J. 1994. Pito (*Erythrina Berteroana*) and Chipilín (*Crotalaria Longirostrata*), (Fabaceae), Two Soporific Vegetables of Central America. *Economic Botany*. 48, 130-38.

Nobata, K., Ina, K. y Ohta, K. 2002. Lower concentrations of clarithromycin suppress urease activity, motility, and binding to gastric epithelial cells in *Helicobacter pylori* isolates. *Digest Liver Diseases*. 34, 489-497.

O'Mahony R., Al-Khtheeri H., Weerasekera D., Fernando N., Vaira D., Holton J. y Basset C. 2005. Bactericidal and anti-adhesive properties of culinary and medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastroenterology*. 11, 7499-7507.

O'Toole, P. W., Lane, M. C. y Porwollik, S. 2000. *Helicobacter pylori* motility. *Microbes and Infection*. 2, 1207-1214.

Padulosi, S., Hoeschle-Zeledon, I. 2004. ¿A qué denominamos especies subutilizadas? *Leisa Revista de Agroecología*. 120, 6-8. [En línea]

Disponible en:

<http://www.leisaal.org/web/images/stories/revistapdf/vol20n1.pdf>

[Último acceso el 20 de Noviembre de 2015]

Pastene, E., Troncoso, M., Figueroa, G., Alarcón, J. y Speisky, H. 2009. Association between polymerization of apple peel polyphenols and inhibition of *Helicobacter pylori* urease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57, 416-424.

Paulo, L., Oleastro, M. y Gallardo, E. 2011. Anti-*Helicobacter pylori* and urease inhibitory activities of resveratrol and red wine. *Food Research International*. 44, 964-969.

Pilbeam, D. J., Polhill, R. M. y Bell, E. A. 1979. Free amino acids and alkaloids of South American, Asian and Australian *Crotalaria* species. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 79, 259-266

Pounder, R y Ng, D. 1995. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Alimentary pharmacology and therapeutics*. 9, 33-9.

Quiñones, M., Miguel, M. y Aleixandre, A. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*. 27, 76-89.

Ramu, G., Mohan, G. y Jayaveera, K. 2011. Preliminary investigation of patchaippasali mucilage (*Basella alba*) as tablet binder. *International Journal of Green Pharmacy*. 5, 24-27.

Rendón, B., Bye, R. y Nuñez-Farfán, J. 2001. Ethnobotany of *Anoda cristata* (L.) Schl. (Malvaceae) in Central México: Uses, management and population differentiation in the community of Santiago Mamalhuazuca, Ozumba, State of Mexico. *Economic Botany*. 55, 545-554.

Rodríguez-González, S., Martínez-Flores, H., Órnelas- Nuñez, J. y Garnica-Romo, M. 2011. Optimización de la extracción del mucilago del nopal (*Opuntia ficus-indica*). XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.

Romaniuk, P., Zoltowska, B., Trus, T., Lane, D., Olsen, G., Pace, N. y Stahl, D. 1987. *Campylobacter pylori*, the spiral bacterium associated with human

gastritis, is not a true *Campylobacter* sp. *Journal of Bacteriology*. 169, 2137-2141.

Ross-Ibarra, J. y Molina-Cruz, A. 2002. The Ethnobotany of Chaya (*Cnidioscolus Aconitifolius* ssp. *Aconitifolius* Breckon): A Nutritious Maya Vegetable. *Economic Botany*. 56, 350-365.

Sachs, G., Scott, D., Weeks, D., Rektorscheck, M. y Melchers, K. 2001. Regulation of Urease for Acid Habitation. En: *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. Mobley, H., Mendz G. y Hazell S. (Eds.) ASM Press. Washington, DC. Capítulo 25.

Schreiber, S., Konradt, M., Groll, C., Scheid, P., Hanauer, G., Werling, H. O., Josenhans, C. y Suerbaum, S., 2004. The spatial orientation of 112 *Helicobacter pylori* in the gastric mucus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101, 5024-5029.

Shukla, R., Sharma, D.C., Baig, M.H., Bano, S., Roy, S., Provazník, I. y Kamal, M.A. 2015. Antioxidant, Antimicrobial Activity and Medicinal Properties of *Grewia asiatica* L. *Medicinal Chemistry*. Oct. PMID: 26516779.

Sierra, F., Forero, J. y Rey, M. 2013. Tratamiento ideal del *Helicobacter pylori*: una revisión sistemática. *Revista de gastroenterología de México*. 79, 28-49.

Sobrino-Cosío, S., Rivera-Ramos, J., Ayala-Aguilar, G. y Bosques-Padilla, F. (2007). Mesa 1. Epidemiología y fisiopatogenia. Tercer Consenso Mexicano sobre *Helicobacter pylori*. *Revista de Gastroenterología de México*. 72, 138-142.

Tellez, J. 2005. Cuantificación de ácidos grasos omega-3 y omega-6 en quelites comestibles de la zona metropolitana de la Ciudad de México en su forma natural, cocidos al vapor y hervidos. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM.

Terahara, N. 2015. Flavonoids in foods: a review. *Natural Product Communications*. 10, 521.

Testerman, T., McGee, D. y Mobley, H. 2001. Adherencia y Colonización. En: *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Mobley, H., Mendz G. y Hazell S. (Eds.) ASM Press. Washington, DC. Capítulo 34.

The Plant List. 2013. Versión 1.1. [En línea]

Disponible en: <http://www.theplantlist.org/> [Último acceso el 31 de Octubre de 2016]

Torres, J., Camorlinga, P. y Bohorquez, C. 2002. Programa de actualización para medicina general, Infectología-2. En: Programa de Actualización Continua en Infectología: Unidad 9, 488-522.

Torres, J., Leal-Herrera, Y., Perez-Perez, G., Gómez, A., Camorlinga-Ponce, M., Cedillo-Rivera, R., Tapia-Conyer, R. y Muñoz, O. 1998. A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in México. *Journal of Infectious Diseases*. 178, 1089-1094.

Trespacios, A., Otero, W. y Mercado, M. 2010. *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin and amoxicillin in Colombian patients. *Revista Colombiana de Gastroenterología*. 25, 31-38.

Trópicos.org. Jardín Botánico de Missouri [En línea]

Disponible en: <http://www.tropicos.org> [Último acceso el 31 de Octubre de 2016]

Vale, F. y Vítor, J. 2010. Transmission pathway of *Helicobacter pylori*: Does food play a role in rural and urban areas? *International Journal of Food Microbiology*. 138, 1-12.

Vazquez, R. A. 2004. Análisis de las propiedades terapéuticas del mucílago de *Opuntia ficus-indica* Mill. con un modelo experimental de gastritis inducida con la administración de etanol en ratas. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Villaseñor, J. L. y Espinosa-García, F. J. 1998. Catálogo de Malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México y Fondo de Cultura Económica. México, D.F.

Walz, A., Odenbreit, S., Mahdavi, J., Borén, T. y Ruhl, S. 2005. Identification and characterization of binding properties of *Helicobacter pylori* by glycoconjugate arrays. *Glycobiology*. 15, 700-708.

Wang, YC. 2014. Medicinal plant activity on *Helicobacter pylori* related diseases. *World Journal of Gastroenterology*. 20, 10368-10382.

Warren, J. R. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. (letter) *Lancet*. i, 1273.

Yildirim, E., Dursun, A. y Turan, M. 2001. Determination of the Nutrition Contents of the Wild Plants Used as Vegetables in Upper Çoruh Valley. *Turkish Journal of Botany*. 25: 367-371.