



EL SABER DE MIS HIJOS  
HARA MI GRANDEZA

# UNIVERSIDAD DE SONORA

UNIDAD REGIONAL SUR

DIVISION DE CIENCIAS E INGENIERIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUIMICO BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

---

---

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD  
ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO  
METANOLICO DE *Hyptis emory*, *Baccharis glutinosa*,  
y *Rhizophora mangle* L. EN CONTRA DE  
*Helicobacter pylori*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO BIOLOGO CLINICO

PRESENTA

*Damaris Raquel Garcia Macías*

NAVOJOA, SONORA

OCTUBRE DEL 2014

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



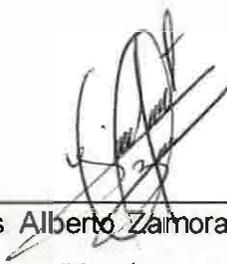
**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado calificador designado para revisar el Trabajo de Tesis Profesional de **Damaris Raquel García Macías**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito para obtener el Título de Químico Biólogo Clínico.



---

M.C. Luis Alberto Zamora Alvarez

Director



---

Dr. Edgar F. Morán Palacio

Secretario

---

Q.B. Martin Gustavo Echeverría Jacobo

Vocal



---

Dra. Norma Patricia Adan Bante

Suplente

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora, Unidad Regional Sur, por ser el centro de mi formación profesional.

A la División de Ciencias e Ingeniería y a al Departamento de Ciencias Químico Biológicas y agropecuarias, por los apoyos brindados en la realización de este proyecto.

A la dirección de Investigación y Posgrado y Vicerrectoría Unidad Regional Sur por el apoyo al proyecto URS-P104 "Evaluación de compuestos bioactivos de extractos de metanólicos de plantas silvestres del sur de Sonora".

Al M.C Luis Alberto Zamora Álvarez por ser mi director de tesis, por el apoyo que siempre me brindo, por su paciencia y por sus consejos para mejorar el trabajo.

Al Dr. Edgar Felipe Moran Palacio por el apoyo que me brindo en toda mi estancia en el Laboratorio de Bioquímica y Toxicología, gracias por permitirme trabajar en el laboratorio a su cargo.

Al Q.B Martin Gustavo Echeverría Jacobo, gracias por ser parte de mi comité de tesis y por los consejos que siempre me dio para mejorar mi calidad como futura química.

A la Dra. Norma Patricia Adán Bante, por aceptar ser parte de mi comité de tesis.

A Don Martin y Don Jesús por hacernos accesibles parte del material requerido durante el desarrollo del trabajo.

## DEDICATORIAS

Todos los logros que pueda obtener durante mi vida serán siempre dedicados a mi madre Fca. Irene Macías Flores, gracias por apoyarme siempre en todo y ayudarme para que pudiera llegar hasta este momento. Todo lo bueno que puede llegar a tener mi persona es gracias a ti, te amo. Y también gracias a ti Héctor, ya que con tu apoyo eh podido realizar mi formación académica.

A mi hermana Paulina y a mi papa Luis Alfonso Garcia, por apoyarme a pesar de la distancia.

A mis tíos, Ventura Flores y Gerónimo medina y Fca. Magdalena Medina. Gracias por abrirme las puertas de su hogar, por estar siempre pendientes de mí y preocuparse por que yo estuviera siempre bien mientras estuve en su casa, los quiero mucho.

A mis hermanas Basthy y Bethel, y a mis sobrinos Bryan Paul, Marcus y Jeremy, ustedes son muy importantes en mi vida y por eso quiero dedicarles mi mayor logro académico hasta hoy.

A mis queridos amigos Ana Elsa, Berenice, Cesar, Ely, Rosalina y Paulina. Con ustedes pase momentos inolvidables, gracias por su apoyo y su amistad.

A mi querido asesor Luis, muchísimas gracias sin tu ayuda esto hubiera sido más complicado para mí y por eso esta dedicatoria es muy especial ya que tú fuiste fundamental para que yo pudiera llagar a este momento.

## CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
JUSTIFICACIÓN.....	x
HIPÓTESIS.....	xi
OBJETIVOS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	14
ANTECEDENTES.....	16
<i>Helicobacter pylori</i> .....	16
Características morfológicas.....	16
Mecanismos de transmisión.....	20
Factores de virulencia.....	20
Principales enfermedades asociadas a la infección por <i>H. pylori</i> .....	24
Gastritis.....	24
Úlcera gástrica.....	24
Cáncer gástrico.....	25
Resistencia a antibióticos.....	26

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora, Unidad Regional Sur, por ser el centro de mi formación profesional.

A la División de Ciencias e Ingeniería y a al Departamento de Ciencias Químico Biológicas y agropecuarias, por los apoyos brindados en la realización de este proyecto.

A la dirección de Investigación y Posgrado y Vicerrectoría Unidad Regional Sur por el apoyo al proyecto URS-P104 "Evaluación de compuestos bioactivos de extractos de metanólicos de plantas silvestres del sur de Sonora".

Al M.C Luis Alberto Zamora Álvarez por ser mi director de tesis, por el apoyo que siempre me brindo, por su amabilidad y sus consejos para mejorar el trabajo.

Al Dr. Edgar Felipe Moran Palacio por el apoyo que me brindo en toda mi estancia en el Laboratorio de Bioquímica y Toxicología, gracias por permitirme trabajar en el laboratorio a su cargo.

Al Q.B Martin Gustavo Echeverría Jacobo, gracias por ser parte de mi comité de tesis y por los consejos que siempre me dio para mejorar mi calidad como futura química.

A la Dra. Norma Patricia Adán Bante, por aceptar ser parte de mi comité de tesis.

A Don Martin y Don Jesús por hacernos accesibles parte del material requerido.

## DEDICATORIAS

Todos los logros que pueda obtener durante mi vida serán siempre dedicados a mi madre Fca. Irene Macías Flores, gracias por apoyarme siempre en todo y ayudarme para que pudiera llegar hasta este momento. Todo lo bueno que puede llegar a tener mi persona es gracias a ti, te amo. Y también gracias a ti Héctor Manuel Perales Acosta, ya que por tu apoyo eh podido realizar mi formación académica

A mi hermana Paulina y a mi papa Luis Alfonso García, por apoyarme aun en la distancia. Gracias por que siempre estar pendientes de mis necesidades, y por siempre brindarme todo lo que necesito y más.

A mis tios, Ventura Flores y Gerónimo medina y Fca. Magdalena Medina. Gracias por abrirme las puertas de su hogar, por estar siempre pendientes de mí y preocuparse por que yo estuviera siempre bien mientras estuve en su casa, los quiero mucho.

A mis hermanas Basthy y Bethel, y a mis sobrinos Bryan Paul, Marcus y Jeremy, ustedes son muy importantes en mi vida y por eso quiero dedicarles mi mayor logro académico hasta hoy.

A mis queridos amigos Ana Eisa, Berenice, Cesar, Ely, Rosalina y Paulina. Con ustedes pase momentos inolvidables, gracias por su apoyo y su amistad.

A mi querido asesor Luis, muchísimas gracias sin tu ayuda esto hubiera sido más complicado para mí y por eso esta dedicatoria es muy especial ya que tú fuiste fundamental para que yo pudiera llagar a este momento.

Mecanismos de resistencia.....	30
Medicina tradicional.....	31
Medicina tradicional en México.....	32
Plantas medicinales en Sonora.....	33
<i>Hyptis emoryi</i> (Salvia).....	34
<i>Baccharis glutinosa</i> (Batamote).....	34
<i>Rhizophora mangle</i> L (Mangle rojo).....	36
Fármacos aislados de plantas.....	39
MATERIALES Y METODOS.....	40
Obtención de la muestra vegetal.....	40
Obtención del extracto metanólico.....	40
Análisis fitoquímico.....	41
Evaluación de la actividad antibacteriana.....	41
Preparación del inóculo.....	41
Microdilución en caldo.....	42
Difusión en disco.....	42
RESULTADOS.....	44
Obtención del extracto metanólico y análisis fitoquímico.....	44
Evaluación de la actividad antibacteriana mediante	
Microdilución en Caldo.....	44

Evaluación de la actividad antibacteriana mediante difusión en disco.....	50
DISCUSIÓN.....	48
CONCLUSIÓN.....	58
RECOMENDACIONES.....	59
BIBLIOGRAFÍA.....	60

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Tasas de resistencia a antibióticos por <i>H. pylori</i> en diferentes continentes.....	28
II	Análisis Fitoquímico de los Extractos Metanólicos.....	44

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Tinción de Gram de un cultivo en placa sobre agar de <i>H. pylori</i> .....	17
2	Microscopia electrónica de <i>H. pylori</i> .....	19
3	Interacciones sinérgicas y antagónicas entre VacA y CagA en la etiología de la infección gástrica por <i>H. pylori</i> .....	23
4	Ejemplar de <i>Hyptis emoryi</i> .....	34
5	Ejemplar de <i>Baccharis glutinosa</i> .....	36
6	Ejemplar de <i>Rhizophora mangle</i> L.....	37
7	Actividad Antibacteriana del extracto metanólico de <i>B. glutinosa</i> sobre el crecimiento de <i>H. pylori</i> (ATCC 43504).....	46
8	Actividad Antibacteriana del extracto metanólico de <i>H. emoryi</i> sobre el crecimiento de <i>H. pylori</i> (ATCC 43504).....	47
9	Actividad Antibacteriana del extracto metanólico de <i>R. mangle</i> L. sobre el crecimiento de <i>H. pylori</i> (ATCC 43504).....	48
10	Efecto inhibitorio del extracto metanólico de <i>B. glutinosa</i> sobre el crecimiento de <i>H. pylori</i> .....	50
11	Efecto inhibitorio del extracto metanólico de <i>H. emoryi</i> sobre el crecimiento de <i>H. pylori</i> .....	51
12	Efecto inhibitorio del extracto metanólico de <i>R. mangle</i> L. sobre el crecimiento de <i>H. pylori</i> .....	52

## JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, el aumento en la incidencia de las infecciones gástricas por *H. pylori* representa uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. En las últimas décadas se ha reconocido su influencia en el desarrollo de cáncer gástrico al grado de ser categorizado como carcinogénico en humanos. Así mismo, se ha observado que el desarrollo de nuevos factores de virulencia y la adquisición de resistencia a los antibióticos han dificultado su tratamiento y erradicación. Ante esta problemática, numerosas investigaciones han puesto su atención en las plantas de uso medicinal, al grado de ser consideradas como una alternativa para la búsqueda y obtención de nuevos fármacos eficaces para el tratamiento de estas infecciones.

## HIPÓTESIS

Los extractos metanólicos de *Hyptis emory*, *Baccharis glutinosa*, y *Rhizophora mangle* L. poseen actividad antibacteriana en contra de *Helicobacter pylori*.

## OBJETIVOS

### General

Evaluar la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *Hyptis emory*, *Baccharis glutinosa*, y *Rhizophora mangle* L. en contra de *Helicobacter pylori*.

### Particulares

- Obtener el extracto metanólico de *Hyptis emory*, *Baccharis glutinosa*, y *Rhizophora mangle* L.
- Evaluar el efecto inhibitorio de los extractos metanólicos sobre el crecimiento de *Helicobacter pylori*

## RESUMEN

Actualmente, las infecciones crónicas de *Helicobacter pylori* sobre la mucosa gástrica se han asociado con la generación de gastritis, úlcera peptídica y cáncer gástrico. Así mismo, se ha establecido que representa un problema de salud pública, y se estima que alrededor del 50% de la población mundial se encuentra infectada. En años recientes, se ha sugerido que el curso asintomático de infecciones persistentes ha sido un factor clave que ha dado lugar a la aparición de cepas resistentes a los fármacos convencionales. Varias investigaciones han demostrado que las plantas de uso medicinal representan una alternativa para la obtención de antibióticos capaces de combatir este tipo de cepas. Ante ello, en el presente trabajo, se planteó como principal objetivo, evaluar la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *Baccharis glutinosa*, *Hyptis emoryi* y *Rhizophora mangle* L. en contra del crecimiento de *H. pylori* (ATCC 43504). Los extractos vegetales fueron obtenidos mediante un proceso de partición sólido-líquido a partir de material vegetal pulverizado y metanol. El efecto inhibitorio se determinó mediante el método de Microdilución en caldo y por difusión en agar. Los resultados obtenidos muestran que solo el extracto de *R. mangle* L. posee actividad antibacteriana. A pesar de ello, el análisis de los datos sugiere que la actividad antibacteriana de *B. glutinosa* y *H. emoryi* se encuentra enmascarada debido a alteraciones en el parámetro de medición, debido a una interferencia dada por la interacción entre los componentes del medio de cultivo y los de los extractos.

## INTRODUCCIÓN

*Helicobacter pylori* es una bacteria Gram negativa, bacilo espiral no formador de esporas, y microaerófilico. Desde su descubrimiento por Barry Marshall y Robin Warren en 1982 la incidencia de las infecciones han en aumentado en todo el mundo. Actualmente, se considera que más del 50% de la población mundial posee algún grado de colonización. En la mayoría de los casos, las infecciones se adquieren vía fecal-oral, la contaminación de suelo, agua y alimentos (Oleastro y Ménard 2013; Stein y cols., 2013; Yang y cols., 2014). Así mismo, ha sido clasificada como carcinógeno categoría 1 en humanos por la Agencia Internacional para la Prevención del Cáncer (IARC). En la mayoría de los pacientes, la infección cursa asintomática, la recurrencia de la infección provoca patologías como gastritis y úlceras gástricas, lo cual promueve la formación de cáncer gástrico (Bridge y Scott 2013; Posselt y cols., 2013). La plasticidad genética y fenotípica de las cepas de *H. pylori* es un factor importante para la epidemiología de sus infecciones en humanos (McClain y cols., 2009; Grande y cols., 2010). Las mutaciones del genoma se ha vuelto un aspecto fundamental en la efectividad del tratamiento prescrito a pacientes infectados. El desarrollo de factores de virulencia, y la presencia de mutaciones asociadas a resistencia a los diferentes fármacos conducen al fracaso de las terapias de erradicación (Garza y col 2007; Vallejos y col 2007). Las terapias actuales incluyen el uso de fármacos como la amoxicilina, claritromicina, metronidazol, tetraciclina y levofloxacino. Sin embargo, se ha reportado que a nivel mundial se ha presentado una creciente resistencia de *H. pylori* a estos antibióticos (De francesco y col., 2010).

Ante la falla de las terapias actuales, es necesario la búsqueda de nuevas alternativas para combatir las infecciones por *H. pylori*. El uso de

plantas en la medicina tradicional de las diferentes regiones mundiales es una alternativa (Nostro y cols., 2005). Las plantas poseen la capacidad de producir sustancias conocidas como metabolitos secundarios que usan como una defensa química contra herbívoros, ayudan también a la planta a tolerar el estrés y a sobrevivir al ecosistema, además les brindan ventajas evolutivas en la competencia del espacio de sobrevivencia y en la búsqueda de nutrientes (Lars y col., 2007; Rodríguez-Fragosa, 2009). Algunos trabajos como los de Eloff 1998; Annuk y cols., 1999; Weseller y cols., 2004; y Nostro y cols., 2005 han reportado la capacidad de algunos extractos de plantas de uso medicinal para inhibir el crecimiento de *H. pylori*. En el sur del estado de Sonora, México, existe una gran variedad de plantas utilizadas con fines medicinales para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales como la colitis, la gastritis y las úlceras pépticas. Entre las plantas utilizadas con tales fines se encuentran las especies *Baccharis glutinosa*, *Hyptis emoryi* y *Rhizophora mangle* L. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la actividad antibacteriana de los extractos vegetales de estas plantas contra el crecimiento de *H. pylori*, con la finalidad de determinar si estas especies vegetales representan una alternativa viable para el aislamiento de nuevos fármacos capaces de contrarrestar las infecciones causadas por *H. pylori* con multirresistentes.

## ANTECEDENTES

### *Helicobacter pylori*

Los primeros estudios sobre *Helicobacter pylori* se realizaron en el año de 1982, cuando los gastroenterólogos australianos Marshall y Warren demostraron la presencia de una bacteria semejante a *Campylobacter* en *biopsias* de pacientes que padecían gastritis, obteniéndose un cultivo puro de la bacteria *H. pylori* demostrándose como agente causal de la gastritis; desde ese año en adelante esta bacteria ha sido muy estudiada. *H. pylori* una tiene amplia relación con el estómago humano y más del 50% de la población mundial presenta en algún grado colonización por este microorganismo. Las cifras de infección varían según las condiciones socioeconómicas y sanitarias en las diferentes regiones, aumentando la incidencia en aquellas poblaciones menos favorecidas (Romo y Coria 2010; Stein y col 2013). Las primeras especies acuñadas al género *Helicobacter* fueron *H. pylori* y *H. mustelae*, aisladas por primera vez a partir de la mucosa gástrica de humanos y de hurones respectivamente. Posteriormente con la revisión de los géneros similares se agregaron las especies de *H. cinaedi* y *H. fennelliae*, las cuales anteriormente consideras dentro del género *Campylobacter* (Agudo 2010).

### Características Microbiológicas

*H. pylori* es una bacteria Gram-negativo (Figura 1), en forma de bacilo curvado semejante a un sacacorchos. Es microaerofílica, presenta de 2 a 6 flagelos monopolares que le permiten ser móvil, los cuales se encuentran recubiertos por una vaina de estructura lipídica al igual que la de membrana lo que los protege y evita su degradación por el medio

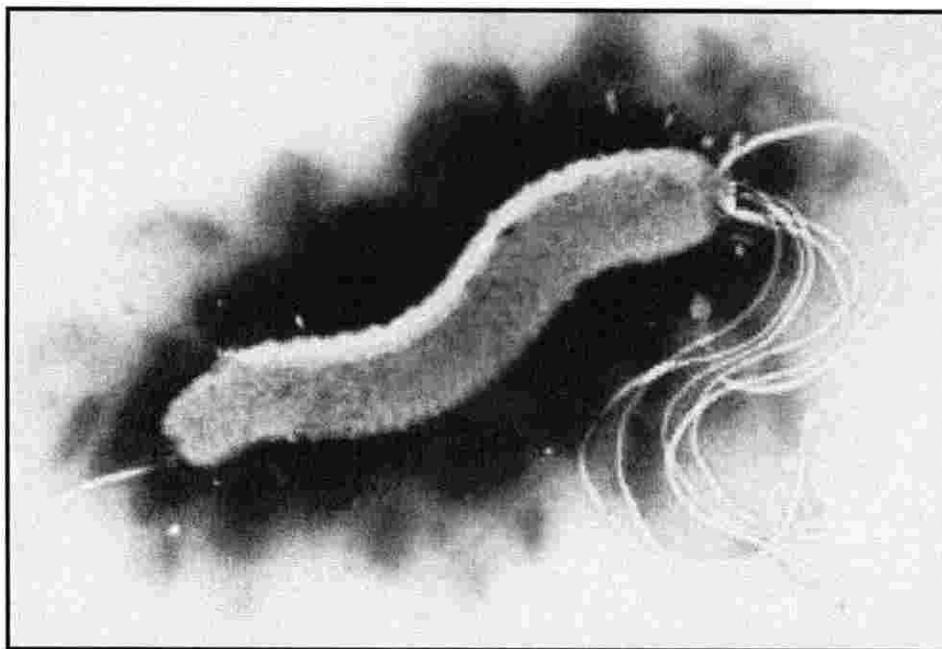


**Figura 1.-** Tinción de Gram de un cultivo en placa sobre agar de *H. pylori*.

Tomado de: Weseler y col. 2004

ácido presente en la mucosa gástrica (Figura 2). Su tamaño se encuentra entre 0.5 a 1.0 micras de ancho y de 3.0 micras de largo (Romo y Coria 2010; Agudo 2010; Yang y cols., 2014). El cultivo de este microorganismo resulta difícil, especialmente en medios líquidos. Los medios en los cuales es posible su cultivo son ricos en nutrientes, tales como caldo brucella, caldo infusión cerebro corazón, caldo tripticasa soya, y caldo Muller-Hinton. Para enriquecer estos medios se puede añadir suero fetal de ternera, empleado con mayor frecuencia y para los medios sólidos se emplea generalmente sangre o sus derivados (Vega y cols., 2002). La temperatura óptima para el crecimiento es de 37° C en atmósferas parciales de CO<sub>2</sub>, aunque también es posible su crecimiento a temperaturas entre el rango de los 35 - 39 °C.

Puede sobrevivir a valores de pH entre 4.0 y 8.5, pero su crecimiento óptimo se da entre 6.0 y 8.5. La morfología de las colonias en medios sólidos se presenta como transparentes, traslúcida, húmeda, no presentan hemólisis, con un diámetro de 2-3 mm, siendo un microorganismo "fastidioso" para su aislamiento. Una característica bioquímica muy conocida de *H. pylori* es su capacidad de producir la enzima ureasa con la cual hidroliza la urea gástrica liberando amonio, con lo cual neutraliza el ácido gástrico incrementando el pH 4.0-6.0 para protegerse del medio ácido que presenta la mucosa gástrica humana (Romo y Coria 2010; Agudo 2010; Yang y cols., 2014).



**Figura 2.-** Microscopia electrónica de *H. pylori*

Tomado de: <http://www.gefor.4t.com/bacteriologia/helicobacterpylori.html>;

Consultado Junio 2014

## **Mecanismos de Transmisión**

La infección por *H. pylori* se encuentra restringida a la mucosa gástrica humana, por lo que se considera al ser humano como reservorio. En la población mexicana, la colonización por esta bacteria suele presentarse desde edad temprana, mostrándose tasas elevadas de los 6 hasta los 10 años de edad. Aproximadamente un 80% de la población mayor a 23 años presentan infección por este patógeno (Romo y Coria 2010). Para *H. pylori* no existe con certeza un método de transmisión, pero el principal apunta a la transmisión fecal-oral, la cual pudiera ser la principal forma de transmisión en poblaciones en vías de desarrollo debido a la deficiencia en las condiciones sanitarias, elevándose los porcentajes de infección. La vía iatrogénica, mediante el contacto de material para endoscopias o pinzas para biopsias contaminadas (Romo y Coria 2010). Estudios epidemiológicos muestran que la exposición de alimentos con agua y suelo contaminados incrementan el riesgo de contagio de persona a persona por transmisión oral-oral, fecal-oral o gastro-oral, hacen mayormente posible la infección por *H. pylori* (Yang y cols., 2014)

### **Factores de virulencia**

Los factores de virulencia de *H. pylori* y la plasticidad presentada por la bacteria, son de gran importancia para la aparición de la infección (Grande y col., 2010). Los genes CagA y VacA son dos factores importantes de virulencia en *H. pylori* los cuales son secretados por el camino del sistema de secreción tipo IV y el tipo V (autotransportador), respectivamente. El sistema de secreción tipo IV sirve para translocar

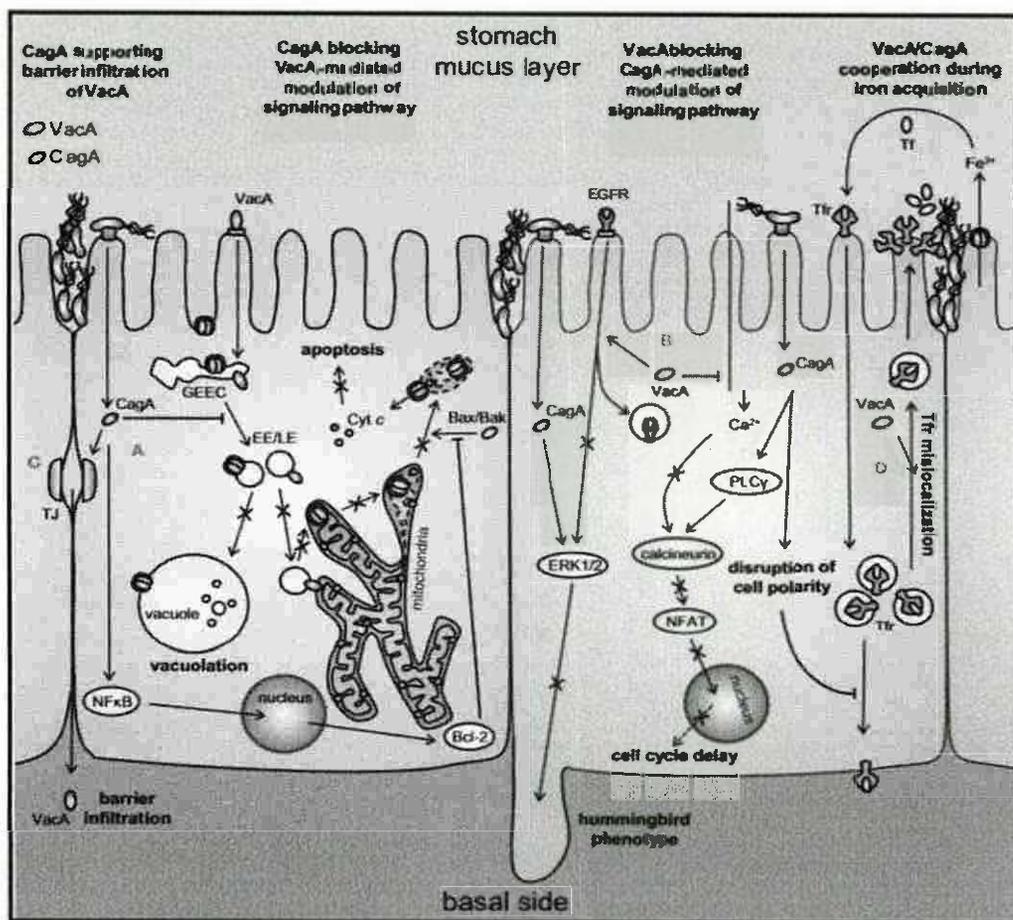
CagA dentro de las células del hospedero, lo que subsecuentemente lleva a la fosforilación de tirosina (McClain y col., 2009).

Uno de los principales factores de virulencia mayormente estudiado de *H. pylori* es CagA, las cepas codificantes del gen *cagA* son altamente virulentas, ejerciendo sus efectos directamente en las células eucariotas. CagA puede regular la respuesta inmune del huésped con lo cual ayuda en la persistencia de las bacterias (Bridge y Merrel 2013). Las proteínas efectoras CagA son las principales moléculas inyectadas a las células epiteliales por el sistema de secreción tipo IV quién las transloca al interior de las células epiteliales proteínas altamente inmunogénicas las cuales son responsables de muchas de las actividades citotóxicas y proinflamatorias que conducen a enfermedades gastroduodenales. Las cadenas de *H. pylori* que codifican este gen (CagA) han sido asociadas con mayor desarrollo de cáncer gástrico (López y cols., 2008; McClain y cols., 2009; Grande y cols 2010).

La citotoxina vacuolizante VacA es considerada uno de los principales factores de virulencia que induce a *H. pylori* a la patogenicidad. El estudio de la toxina desde el descubrimiento hace poco más de 25 años ha sido difícil, debido a que la toxina posee una serie de características sorprendentes e inusuales que no encajan en los conceptos actuales de toxinas bacterianas. Sin embargo, VacA (*vacA*) presenta propiedades interesantes e importantes que se han hecho evidentes. En primer lugar, el gen que codifica VacA se caracteriza por un alto grado de variación genética; se ha observado que cepas con variantes alélicas de *vacA* que presentan mayores niveles de actividad citotóxica mediada in vitro por lo que se asocian con un mayor riesgo de enfermedad gástrica en humanos infectados con *H. pylori*. (Kim y Blanke 2012)

Las contribuciones de VacA y CagA a la modulación del epitelio del huésped son fundamentalmente diferentes. CagA, como un efector de Tipo IV se inyecta directamente en el citosol eucariótico, modula las propiedades funcionales de sólo aquellas células que *H. pylori* tienen específicamente colonizadas. En contraste, VacA puede actuar tanto en el sitio proximal de unión bacteriana a la membrana epitelial, así como en las células epiteliales no infectados después de la difusión desde el sitio de bacterias adherentes. Así, las células epiteliales infectadas se prevé que sean sujetos a los efectos moduladores de tanto VacA y CagA (Figura 3).

Existe alguna evidencia de que algunos de los efectos moduladores celulares de VacA y CagA pueden ser sinérgicos. Por ejemplo, un informe reciente de VacA y CagA pueden facilitar la adquisición de hierro de *H. pylori* de la superficie apical de monocapas epiteliales polarizadas, sin dañar gravemente las células huésped (Tan y cols., 2011; Kim y Blanke 2012). Sin embargo, la mayoría de los estudios hasta la fecha que las actividades no móvil de VacA y CagA son fundamentalmente antagónica. VacA y CagA inhiben los efectos del otro sobre las células epiteliales, con CagA abajo de la regulación vacuolización celular, y VacA abajo de la regulación del fenotipo colibrí de las células epiteliales gástricas asociadas con la inyección CagA (Kim y Blanke 2012).



**Figura 3.-** Interacciones sinérgicas y antagónicas entre VacA y CagA en la etiología de la infección gástrica por *H. pylori*.

## **Principales Enfermedades Asociadas a la Infección por *H. pylori***

Las infecciones por *H. pylori* generalmente son adquiridas desde la infancia, y pueden permanecer en el individuo durante toda su vida sin necesidad de administrar algún tipo de tratamiento para erradicarla. En la etapa adulta después de persistir la infección por varias décadas, se pueden desarrollar algunas patologías gastrointestinales, incluyendo la inflamación gástrica, úlcera péptica, cáncer gástrico, y linfoma gástrico de tejido linfoide asociado a la mucosa (McClain y cols., 2009). *Helicobacter pylori* se encuentra clasificada en el grupo 1 según la IARC (The International Agency for Research on Cancer) desde 1994, lo indica que la infección provocada por este patógeno es causante de cáncer para el ser humano (Yang y cols., 2014).

### **Gastritis**

La inflamación de la mucosa gástrica o gastritis crónica no autoinmune, es causada por *H. pylori*. Todos los pacientes infectados por la bacteria presentan gastritis histológica. La gastritis se presenta cuando existe un desequilibrio entre los factores citotóxicos y citoprotectores en el tracto gastrointestinal superior. Entre los mecanismos tóxicos se encuentran: pepsina y los ácidos biliares y *H. pylori*. La bacteria afecta la mucosa gástrica ya que produce lipasas y proteasas, pero el factor más importante de virulencia se relaciona con una toxina vacuolizante (*VacA*) y otra proteína (*CagA*) con efecto citotóxico (Gutiérrez y cols., 2008).

### **Úlceras gástricas**

La pérdida de continuidad del epitelio es la denominada úlcera peptídica o gástrica. Ubicándose con mayor frecuencia en la primera porción del

duodeno siendo relacionada su aparición por la presencia de *H. pylori* ya sea en el antro o duodeno. Al encontrarse en el antro, la producción de ácido se ve favorecida, el cual al llegar al duodeno daña el epitelio. En el duodeno la aparición de células dendríticas y la subsecuente activación del sistema inmune favorece la formación de úlcera (Suárez y cols., 2011). Las personas que desarrollan úlcera gástrica presentan niveles elevados de inflamación del corpus, multifocales, atrofia gástrica, y bajos niveles de la secreción de ácido del estómago, debido a la destrucción de las células parietales secretoras de ácido del estómago (Dorer y cols 2009).

### **Cáncer gástrico.**

Se define como cáncer gástrico a la formación de adenocarcinomas en el estómago, siendo las neoplasias más frecuente en el tubo digestivo, y el 95% de los tumores de este órgano (Arana y Corona <http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no47-5/RFM47506.pdf>; Consultado Junio 2014). El cáncer gástrico es el cuarto tipo de cáncer más común en el mundo, y la segunda causa relacionada a cáncer en el mundo. Aunque la incidencia de este en países desarrollados ha ido disminuyendo, en países como México y Chile, las cifras han aumentado ligeramente. La organización mundial de la salud OMS, ha clasificado a *H. pylori* en clase 1 como carcinogénico humano. Son numerosos estudios que han demostrado que las probabilidades de desarrollar cáncer gástrico son más elevadas en aquellas personas que presentan infección por esta bacteria, aumentando hasta seis veces más las posibilidades de presentar esta patología (Camorlinga-Ponce y cols., 2008).

## Resistencia a antibióticos

Lograr la erradicación de cualquier agente patógeno implica siempre la combinación de varios factores. En el caso de *H. pylori* el fallo en erradicar la bacteria se ha vuelto común, esto debido en algunos casos a la falta del seguimiento correcto del tratamiento indicado, y en muchos otros casos al régimen de fármacos utilizados. Las mutaciones de *H. pylori* se ha vuelto un aspecto importante al momento de tratar a los pacientes infectados, ya que las mutaciones van generando resistencia a los diferentes fármacos empleados en los diversos tratamientos. La detección de resistencia a antibióticos es crucial en el manejo de la infección por *H. pylori* (Garza y cols., 2007; Vallejos y cols., 2007).

La administración del antibiótico claritromicina durante un periodo de 7 a 14 días es el tratamiento actual de primera línea en países europeos y en los Estados Unidos de América. La terapia triple basada en levofloxicina, ha sido informada y demostrada en algunos países, la cual parece ser más eficaz como tratamiento de primera línea aunque se han mostrado algunas controversias en este. En años recientes se ha demostrado que la resistencia a los dos anteriores fármacos de algunas cepas de *H. pylori* es debida a las mutaciones de los genes 23S rRNA y A (*gyrA*) para claritromicina y levofloxicina respectivamente. Las mutaciones A2143G, A2142G, y A2142C se identificaron en 69,8%, 11,7% y 2,6% de las cepas resistentes de *H. pylori* a la claritromicina (Jyh-Ming y cols., 2010).

A pesar de que las terapias de combinación de fármacos han sido aplicadas exitosamente a las cepas resistentes, se está observando un incremento de la resistencia contra estos fármacos, por lo cual se buscan nuevas estrategias de intervención (Löwer y cols., 2011). Es necesario

investigar la resistencia local de *Helicobacter pylori* a antibióticos para así poder elegir una terapia efectiva en enfermedades asociadas con la bacteria. Las evidencias sugieren que la prueba de sensibilidad a antibióticos resulta en incremento de las tasas de erradicación (Sun y cols., 2009; Wenzhen y cols., 2010). En algunos tratamientos comúnmente se utiliza un supresor de ácido (inhibidor de la bomba de protones) o un antagonista del receptor H2 (ejemplo: ranitidina), aunados a dos antibióticos usualmente se elige entre amoxicilina, metronidazol o claritromicina. La combinación de dos antibióticos puede mantener el éxito de la terapia de erradicación y disminuir la posibilidad de resistencia antibiótica secundaria (Farshad y cols., 2010; Sun y cols., 2009)

La creciente resistencia a menudo es paralela al patrón de consumo de antibióticos y puede variar dentro de grupos de pacientes de acuerdo con su región geográfica, edad, sexo, tipo de enfermedad, condiciones socioeconómicas otras infecciones y otros factores. Recientemente levofloxacino, tetraciclina y furazolidona han sido recomendadas en terapias primarias o de rescate en algunas áreas. La tabla I, muestra las tasas de resistencia de *H. pylori* a diversos antibióticos en los 5 continentes (Farshad y cols., 2009; Sun y cols., 2009). El mapa geográfico y el proceso de la resistencia primaria de *H. pylori* son clínicamente importantes y deben ser considerados al momento de elegir los regímenes de erradicación como es el monitoreo constante a nivel nacional y global en un intento de alcanzar la meta recomendada de erradicar más del 95% de casos de resistencia. La prevalencia de la resistencia a claritromicina, metronidazol y amoxilina varía entre países y es más alta para metronidazol. La resistencia a tetraciclina y ciprofloxacino es poco común (Farshad y cols., 2009).

Diversos estudios han demostrado que la resistencia primaria a claritromicina es el principal factor predictivo de la falla terapéutica

**Tabla I. Tasas de resistencia a antibióticos por *H. pylori* en diferentes continentes.**

Área	Amoxilina	Claritromicina	Metronidazol	Tetraciclina	Levofloxacino	Multifármacos
<b>América</b>	8/352	118/402	177/401	11/393	NA	53/352
	2.2%	29.3%	44.1%	2.7%		15.0%
<b>África</b>	113/172	NA	159/172	58/132	0/40	NA
	65.6%		92.4%	43.9%	0.0%	
<b>Asia</b>	60/517	1544/8139	192/517	11/456	106/908	21/252
	11.6%	18.9%	37.1%	2.4%	11.6%	8.3%
<b>Europa</b>	3/599	352/3156	420/2459	14/599	148/614	204/2272
	0.5%	11.1%	2.1%	2.1%	24.1%	8.9%
<b>General</b>	184/1640	2014/11697	948/3549	94/1580	254/1562	278/2876
	11.2%	17.2%	26.7%	5.9%	16.2%	9.6%

Fuente: Tomado De Francesco y cols., 2010.

(Mansour y cols., 2009). En muchos casos este medicamento es la clave de la triple terapia, sin embargo la resistencia a claritromicina se ha convertido en una de las razones principales del fracaso del tratamiento. La prevalencia de la resistencia a claritromicina varía entre diferentes países, de 10.6-25% en Estados Unidos, 16% en Japón y 1.7-23.4 en países Europeos (Agudo y cols., 2010):

La resistencia a Metronidazol fue la primeramente descrita, y en reportes recientes los rangos de resistencia van de 10-50% en Europa, mientras que en Estados Unidos se presenta un 37%, aunque estos valores varían dependiendo del grupo étnico estudiado (Wenzhen y col., 2010). Anualmente en miles de personas falla la terapia de erradicación de *Helicobacter pylori*, en gran medida porque es administrada empíricamente. Alrededor del mundo la triple terapia aplicada empíricamente tiene tasas de éxito muy por debajo del 80% de efectividad (Graham 2009) y la resistencia secundaria se ha incrementado notablemente hasta a un 70%. Para resolver este problema se necesitan pruebas de susceptibilidad antes de aplicar una terapia de erradicación, en especial con pacientes tratados previamente para *Helicobacter*, o aquellos que se han expuesto a los mismos antibióticos comúnmente usados para tratar la infección por *Helicobacter pylori* (Wenzhen y cols., 2009). Debido a la creciente resistencia presentada a claritromicina, amoxicilina y metronidazol (Agudo y cols., 2010; Mansour y cols., 2010; Siavoshi y cols., 2010; Zhang y cols., 2010), se han elegido antibióticos como levofloxacino, tetraciclina y furazolidona en terapias primarias o de rescate en contra de *Helicobacter pylori* (Sun y cols., 2009).

## Mecanismos de resistencia

Una serie de factores han sido implicados como causa de la falla del tratamiento, incluyendo la penetración inefectiva de los antibióticos dentro de la mucosa gástrica, la inactivación de antibióticos por el bajo pH del estómago, falta del cumplimiento completo de la terapia por parte del paciente, y la resistencia emergente que presenta *Helicobacter pylori* a los diversos antibióticos frecuentemente usados (Agudo y col., 2010). Un factor importante para la evolución de la resistencia, es que muchos de los antibióticos usados para erradicar *Helicobacter pylori*, son también usados en otro tipo de enfermedades; el fármaco metronidazol es utilizado en parasitosis, tetraciclina es usado en enfermedades respiratorias, infecciones intestinales, diarrea y cólera, claritromicina es usado también en enfermedades respiratorias, mientras que amoxicilina es prescrito en faringitis estreptococcica e infecciones del tracto urinario. Furazolidona es recomendada en casos de giardiasis (Siavoshi y col., 2010).

La resistencia bacteriana a fármacos puede ser una propiedad intrínseca, relacionada con genes cromosomales, sin embargo esta también puede ser adquirida por genes foráneos acarreados en elementos genéticos móviles (transferencia horizontal de genes) o la combinación de ambos (Siavoshi y col., 2010). Se ha demostrado que la resistencia a diferentes antibióticos se desarrolla en *Helicobacter pylori* por medio de la adquisición de mutaciones cromosómicas en el sitio de acción del fármaco (Farshad y col., 2010).

## Medicina Tradicional

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se define como medicina tradicional al el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales (<http://www.who.int> Consultado: Junio 2014) En el contexto del uso tradicional de las plantas con propiedades medicinales se usan partes como hojas, tallo, corteza o raíz, lo que se piensa cura se la afección, lo cual es sometida a ebullición en agua. Esta decocción se toma como té o agua de uso, dependiendo de la enfermedad a tratar y de los usos y costumbres de la población en donde la infusión es utilizada (Bisi-Johnson y cols., 2011; Reyes-García 2010).

Con la implementación y producción de nuevos fármacos, el uso de plantas para tratar enfermedades y dolores recurrentes quedó relegado por algunas décadas, sin embargo, hoy en día existe un creciente interés en el uso de esta terapia, no sólo por parte de las poblaciones rurales que basan la mayor parte de sus tratamientos en la medicina tradicional, sino también en el ámbito científico que se encuentra intrigado por la posible capacidad que pueden tener estos productos naturales de atenuar o eliminar enfermedades producidas por microorganismos (Reyes-García 2010; Bisi-Johnson y cols., 2011). Las estructuras elucidadas a partir de extractos obtenidos de plantas de uso medicinal, aisladas y caracterizadas comúnmente son conocidas como compuestos bioactivos, los cuales son metabolitos secundarios de las plantas, los cuales no intervienen en el metabolismo primario de la planta, si no que son compuestos provenientes del metabolismo secundario, y le

ayudan a la planta para protegerse en contra de agresiones por patógenos, o predadores. Son precisamente éstos compuestos bioactivos a los cuales se les atribuye la capacidad de combatir las infecciones producidas por microorganismos en el organismo humano, ya sea inhibiendo el crecimiento o destruyendo a los microorganismos (Lars y cols., 2007, Pitchai y cols., 2010, Hadacek y cols., 2011).

### **Medicina tradicional en México**

La integración médica de México, en los campos de investigación clínica, y terapéutica, ha sido lenta, lo que ha mantenido a la medicina tradicional en un rezago nacional e internacional. Es importante rescatar las riquezas heredadas del conocimiento tradicional y poderle dar un uso actual que sea beneficioso para la salud de la población. La validación clínica, preventiva, terapéutica, y profiláctica que pueda convertir a la Medicina Tradicional Mexicana, como una alternativa viable científica de vida y salud; es un reto actual para las ciencias de la salud (Rojas 2009 <http://www.tlahui.com/libros>; consultado junio 2009). El empleo de plantas medicinales es una actividad común en todo México y está muy unida a las condiciones económicas, la falta de cuidados médicos y condiciones insalubres, mal nutrición y salarios bajos, esto conjunto al alto costo de algunos medicamentos, han contribuido a que las personas necesiten usar tanto la medicina tradicional como la convencional para mantener la salud (Estrada y col., 2007).

Existe abundante información acerca del uso de plantas en el sur de México, en la cual se muestra la importancia y el gran legado del conocimiento acerca de los diferentes usos y aplicaciones de las plantas, ahora también usadas ampliamente en el norte del país. (Estrada y cols.,

2007; Garibay y cols., 2007). La mayoría de infusiones son preparadas hirviendo los componentes de la planta como hojas, flores, y partes del tallo. En muchos casos sólo es necesaria una especie, sin embargo puede prepararse un té con dos o más especies, dependiendo de la enfermedad a tratar (Estrada y col., 2009; Rodríguez-Fragosa, 2009; Ruan y col., 2006). El concepto de diferentes componentes como principio activo actuando de forma sinérgica en infusiones herbales puede ser inusual, sin embargo como ocurre en los tratamientos herbales mexicanos, el efecto puede provenir de la suma de los diferentes constituyentes activos de la o las plantas usadas en la infusión, y producto de una monoterapia usando un agente específico, aunque esto también es posible (Rodríguez-Fragosa, 2009).

Diversos estudios llevados a cabo en el sur de México revelan la rica diversidad de plantas de la nación y el extenso conocimiento del uso de plantas. En el estado de Hidalgo 101 plantas son utilizadas con diferentes propósitos, de estas 101 plantas el 47% se usan con fines medicinales mientras que en estados como Puebla, el 90% de un total de 49 especies utilizadas es ingerido como infusión herbal, en Oaxaca 80 especies son usadas con fines terapéuticos y en Quintana Roo son 83 las especies de plantas que sirven para estos propósitos medicinales (Estrada y cols., 2009).

### **Plantas Medicinales en Sonora**

El estado de Sonora posee una flora muy diversa. En esta región se pueden encontrar matorrales, pastizales y bosques templados. En la región del sur de Sonora podemos encontrar tanto pastizales como bosques tropicales (Johnson y col., 1996). Algunas de éstas plantas que forman parte de la MT en el sur de Sonora son gobernadora (*Larrea*

*tridentata*), chamizo (*Ambrosia dumosa*), zacate galleta (*Pleuraphis rigida*) y ocotillo (*Fouquieria splendens*) las cuales han sido empleadas para tratar algunas enfermedades (Johnson Gordon y col., 2006).

### ***Hyptis emoryi* Torr (Salvia)**

El nombre común de esta planta es "Salvia". Es un arbusto perteneciente a la familia *Labiata*, nativo de 0.5-3 m de altura, con ramas cinéreas con pelos finos, amontonados dendriticamente ramificados formando una capa mas o menos aspera de lana blanca o gris. Sus hojas son lanceolando-ovaladas a anchamente ovadas y ocasionalmente suborbiculares, agudas o redondeadas en el apice, cuneadas a trunqueadas de 8-25 mm de ancho por 1.5-4.5 cm de largo con márgenes aserrado-dentados. Se localiza en arrollos, cañones y pendientes rocosas en la parte norte, central y sur del estado de Sonora. Se emplea en enfermedades como bilis, tos, resfriado, pasmo de parto, asma y dolor de muelas. Se utilizan las hojas, flor y punta de las ramas (Figura 4).

### ***Baccharis glutinosa* (Batamote)**

Arbusto nativo ramificado con altura de 2-5 m, conocido en la región como "Batamote", sus ramas son estriadas, glabras y espárcidamente granular-glutinosa; posee hojas lineares a lanceoladas con un ancho de 4-18 mm por 5-12 mm de largo, acuminadas en el apice, angostamente y atenuadamente cuneadas en la base. Las flores poseen lobulos ligeramnte estaminados extendiéndose hasta arriba de las cerdas del papo; corolas pistiladas mucho más cortas que el papo, las ramas del



**Figura 4.-** Ejemplar de *Hyptis emoryi*

estilo excertas 1-1.5 mm, cerca de 1 mm de largo con cinco costillas bajas glabros. Se utilizan las ramas, raíz y hojas. Se emplea en afecciones del estomago (dolor), para los riñones, y dolor de muelas (Figura 5).

### ***Rhizophora mangle L* (Mangle rojo)**

Arbusto a árbol nativo de hasta 25 m de alto; perteneciente a la familia *rizhophraceae*, su nombre común es "Mangle rojo" (Figura 6), tiene una corteza delgada, grisácea, someramente surcada o casi lisa sobre los tallos jóvenes; hojas elípticas y color verde oscuro, agudas en el ápice, base más o menos decurrentes sobre el peciolo. Se puede localizar en playas lagunas lodosas de bahías o esteros de la costa del golfo de California. Florece de marzo a noviembre. Se usa la raíz seca y el fruto para elaborar un té que ayuda a eliminar los síntomas de la disentería (Johnson Gordon y col., 2006).



**Figura 5.-** Ejemplar de *Baccharis glutinosa*.



**Figura 6.-** Ejemplar de *Rhizophora mangle* L.

## **Fármacos Aislados de Plantas**

El uso de plantas como medicamentos ha involucrado el aislamiento de compuestos activos. El aislamiento y caracterización de compuestos farmacológicamente activos de plantas medicinales continúa hasta nuestros días sometiendo a diversas plantas a exploración en búsqueda de compuestos bioactivos (metabolitos secundarios). La investigación sobre la composición química de plantas medicinales, y especialmente los metabolitos secundarios es un campo de investigación dinámica en el mundo y es la base para el descubrimiento de nuevos fármacos (Pitchai y cols., 2010). Los metabolitos secundarios no son desperdicios químicos de las plantas, sino una defensa química contra herbívoros, ayudan también a la planta a tolerar el estrés y a sobrevivir al ecosistema, además les brindan ventajas evolutivas en la competencia del espacio de sobrevivencia y en la búsqueda de nutrientes (Lars y cols., 2007). Los metabolitos secundarios (MS) de las plantas pueden presentar propiedades biológicas, pudiendo desempeñar funciones ecológicas, a estos pueden darse diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros. (Avalos y Pérez-Urria 2009)

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Obtención de la Muestra Vegetal**

Especímenes vegetales con las características descritas por Johnson y col., 1996 para las especies *Hyptis emoryi* (Salvia), *Baccharis glutinosa* (Batamote), y *Rizophora mangle* L (Mangle rojo) fueron colectados en los municipios de Cajeme y Hutabampo. Las características taxonómicas de las muestras colectadas fueron validadas en el Herbario de la Universidad de Sonora por el Ing. Jesús Sánchez. Todas las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Bioquímica y Toxicología, diseccionadas y secadas en la sombra a temperatura ambiente de 25 °C. Posteriormente fueron trituradas en un molino eléctrico marca Thomas Scientific modelo 3383-L10. Las muestras pulverizadas fueron depositadas en bolsas de polietileno y almacenadas hasta su utilización (Musyimi y cols., 2008; Flores y cols., 2008).

### **Obtención del Extracto Metanólico**

Los extractos fueron obtenidos mediante un proceso de extracción por partición sólido-líquido utilizando metanol grado reactivo. Para ello, las muestras pulverizadas fueron mezcladas con metanol en una relación 1:10 (p/v) y luego puestas en agitación constante por 96 horas a 25 °C. Finalizada la extracción, la solución fue filtrada por gravedad con papel Whatman No. 4 y luego filtrada al vacío con papel Whatman No.1. La solución filtrada se concentró en un evaporador rotatorio marca Yamato RE 300 a una temperatura entre los 40-45 °C. El concentrado obtenido

fue dominado extracto metanólico, fue colectado y almacenado se almacenó a 4°C hasta su utilización (Mothana y cols., 2009).

### **Análisis Fitoquímico**

El análisis de los principales grupos de compuestos químicos presentes en las muestras se realizó en base a las técnicas expuestas por Jones y Kinghorn 2006; Egwaikhede y Gimba 2007; y Baso 2009, con algunas modificaciones. Para ello, en cada caso se utilizó 1 mg de extracto. Para la determinación de alcaloide se utilizó el reactivo de Meyer y el de Dragendorff. Los polifenoles fueron detectados por el ensayo del cloruro férrico. La presencia de terpenos se determinó mediante el ensayo de Salkowski. La presencia de sesquiterpenlactonas se realizó en utilizando el reactivo de Baljet. La reacción de gelatina fue usada para determinar la presencia de taninos. La presencia de flavonoides se determinó mediante H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el ensayo de Shinoda. Finalmente, se realizó la prueba para determinar la presencia de saponinas, al igual que el ensayo de Liebermann-Burchard para determinar la presencia de compuestos esteroidales.

### **Evaluación de la Actividad Antimicrobiana**

#### **Preparación del Inóculo**

El cultivo primario de *Helicobacter pylori* fue realizado en caldo Müller-Hinton adicionado con suero de caballo al 10% a partir de un cultivo criopreservado. Los medios fueron incubados a 37°C por 3 días en una atmósfera microaerofílica. A partir del cultivo primario se preparó un subcultivo con caldo Müller-hinton enriquecido con 10% de suero de

caballo, incubando por 24 horas bajo las mismas condiciones. Después el cultivo fue ajustado a 0.5 en la escala de MacFarland para obtener una concentración de  $10^8$  UFC/mL (Pérez y cols., 2007).

### **Microdilución en Caldo**

Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos estériles de fondo plano. Se prepararon diluciones seriadas a la mitad de los extractos en dimetilsulfóxido (DMSO) y caldo Müller-Hinton a concentraciones finales de 3200, 1600, 800 y 400  $\mu\text{g/mL}$ . Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se utilizaron 100  $\mu\text{L}$  del inóculo ajustado, y 100  $\mu\text{L}$  de la dilución de cada extracto a cada concentración. Como control de prueba se utilizaron 100  $\mu\text{L}$  de caldo Mueller-Hinton y 100  $\mu\text{L}$  de cada dilución del extracto. Como control positivo de crecimiento se utilizaron 100  $\mu\text{L}$  del inóculo y 100  $\mu\text{L}$  de caldo Mueller-Hinton con DMSO a la concentración más alta utilizada. Todas las placas se incubaron a 37 °C por 24 horas en una atmósfera microaerofílica (5% de  $\text{O}_2$ , 10%  $\text{CO}_2$ , 85%  $\text{N}_2$ ). Se realizaron lecturas espectrofotométricas a 630 nm cada veinticuatro horas por noventa y seis horas. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado (Gurinder y Daljit 2009).

### **Difusión en Disco**

Para determinar la actividad antibacteriana de manera cualitativa, se realizó el método de difusión en disco (Haider y col 2009). Para ello, 10  $\mu\text{L}$  del inóculo de trabajo fueron sembrados en forma masiva agar Müller-hinton enriquecido con 10% de suero de caballo. Discos estériles de papel filtro Whatman No. 1 de 0.6 cm de diámetro impregnados con 13  $\mu\text{L}$  de la dilución de 1,600  $\mu\text{g/mL}$  de cada uno de los extractos metanólico, y fueron colocados en el centro de las placas Petri.

Todas las placas fueron incubadas bajo condiciones microaerofilicas a 37 °C y revisadas a 24, 72 y 120 horas. Se utilizaron controles de esterilidad de los discos de papel filtro, y un discos impregnados con una solución de DMSO a 6.25 % en caldo Mueller-Hinton para el control positivo de crecimiento. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

## RESULTADOS

### Obtención del Extracto Metanólico y Análisis Fitoquímico

A partir de 50 g de la muestra vegetal se obtuvieron para *R. mangle* L. 20 g de extracto metanólico, 6 g de extracto para *B. glutinosa*, y 6.38 g de extracto para *H. emoryi*. Estos valores corresponden a porcentajes de rendimiento del: 40 %, 12 % y 12.76 % respectivamente. El análisis cualitativo de los constituyentes químicos de los extractos mostro que existen diferencias entre sus perfiles fitoquímicos (Tabla II). El extracto de *R. mangle* L. fue el único que dio prueba positiva para flavonoides, y a diferencia de los otros extractos no dio resultados positivos para la presencia de compuestos esteroidales. Por otro lado, en extracto de *B. glutinosa* fue el único que dio prueba positiva en la determinación de alcaloides, y al igual que *H. emoryi* dio prueba positiva para la presencia de compuestos esteroidales. Finalmente, se encontró que los extractos poseen diferentes solubilidades en caldo Mueller-Hinton utilizando DMSO como vehículo. De los tres extractos el de *R. mangle* L. fue disuelto con facilidad, mientras para los otros se necesitó más tiempo y fuera de agitación.

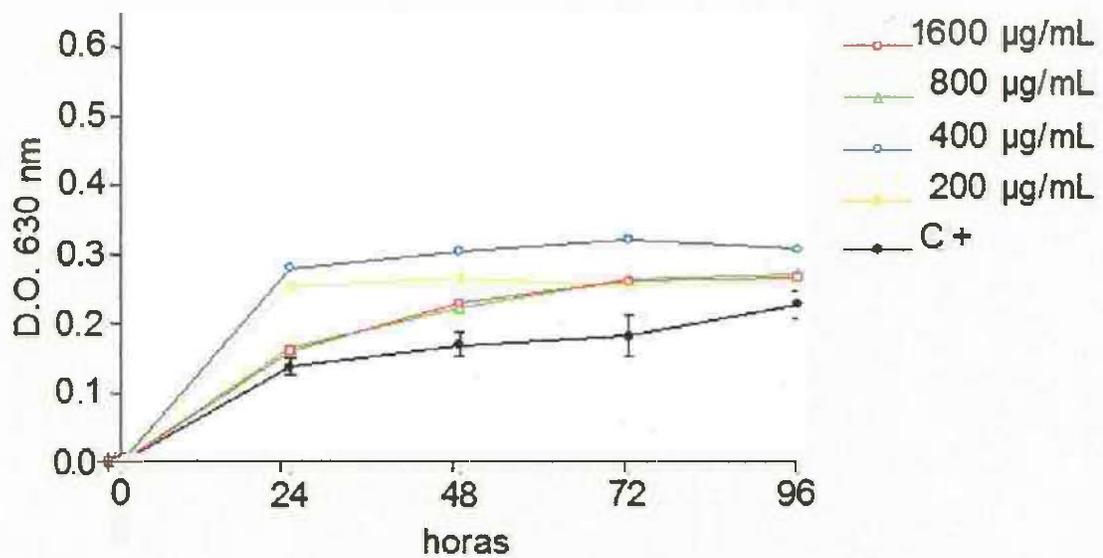
### Evaluación de la Actividad Antibacteriana Mediante Microdilución en Caldo

La figura 7 presenta los resultados de la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *Baccharis glutinosa* en contra del crecimiento de *H. pylori*. La medición de la D.O. muestra que no se presentó inhibición a ninguna concentración (200, 400, 800 y 1600 µg/mL) durante las 96 horas de evaluación. Los datos muestran que entre las diferentes concentraciones evaluadas, existen diferencias y similitudes en los

**Tabla II.- Análisis Fitoquímico de los Extractos Metanólicos**

Ensayo	Muestra		
	<i>R. mangle L</i>	<i>H. emoryi</i>	<i>B. glutinosa</i>
Alcaloides	-,-	-,-	+,+
Polifenoles	+	+	+
Terpenos	+	+	+
SesquiterpenLactonas	+	-	-
Taninos	+	+	+
Flavonoides	+,+	-,-	-,-
Esteroles	-	+	+
Saponinas	+	-	-

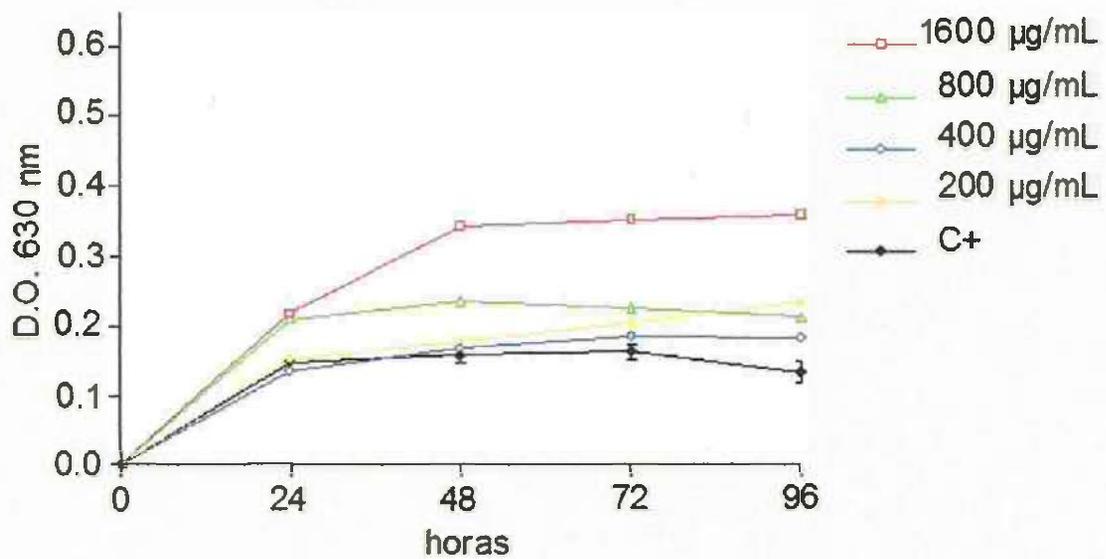
(+):Positivo;(-): Negativo;(+,+): Positivo para dos pruebas; (-,-): Negativo para dos pruebas.



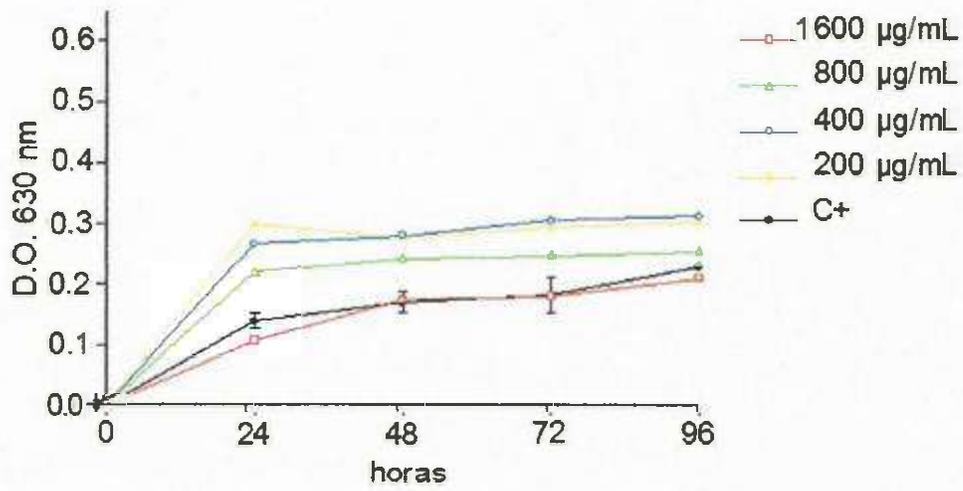
**Figura 7.-** Actividad antibacteriana del extracto metanólico de *B. glutinosa* sobre el crecimiento de *H. pylori* (ATCC 43504).

patrones cinéticos de crecimiento de *H. pylori*. En la figura 7 se observa que a una concentración de 1600 y 800  $\mu\text{g/mL}$  las cinéticas de crecimiento describen el mismo patrón, mientras que a una concentración de 400 y 200  $\mu\text{g/mL}$  las cinéticas poseen la misma tendencia. Al igual que *B. glutinosa*, el extracto metanólico de *Hyptis emoryi* no presentó un efecto inhibitorio importante. De todas las concentraciones evaluadas, solo a 400  $\mu\text{g/mL}$  inhibió el 7.9 % del crecimiento de *H. pylori* durante las primeras 24 horas de evaluación (Figura 8). De manera análoga a lo observado en *B. glutinosa*, las cinéticas de crecimiento presentaron patrones de comportamiento similares entre sí. En primer lugar, parece existir una relación positiva entre la concentración del extracto y el aumento en la densidad óptica (D.O.). En segundo, las cinéticas de crecimiento obtenidas a concentraciones de 200 y 400  $\mu\text{g/mL}$  describen el mismo patrón, mientras que a una concentración de 800 y 1600  $\mu\text{g/mL}$  se observan cinéticas con la misma tendencia.

La evaluación de la actividad antibacteriana del extracto metanólico de la corteza de *R. mangle* L. arrojó resultados diferentes a los obtenidos con los extractos anteriores. A una concentración de 1600  $\mu\text{g/mL}$  inhibió el 22.9 % del crecimiento de *H. pylori* durante las primeras 24 horas de evaluación, pero no se mostró inhibición bajo el efecto de las concentraciones restantes (Figura 9). Bajo el efecto de este extracto, se obtuvieron patrones de crecimiento cinético completamente diferentes a los originados por el efecto de los otros extractos. Contrario a *H. emoryi*, parece existir una relación negativa entre la concentración del extracto y el aumento en la densidad óptica (D.O.), pues a mayor concentración encontramos menor D.O. Así mismo, se observó que las cinéticas obtenidas bajo el efecto de las diferentes concentraciones, poseen una tendencia similar.



**Figura 8.** Actividad antibacteriana del extracto metanólico de *H. emoryi* sobre el crecimiento de *H. pylori* (ATCC 43504).

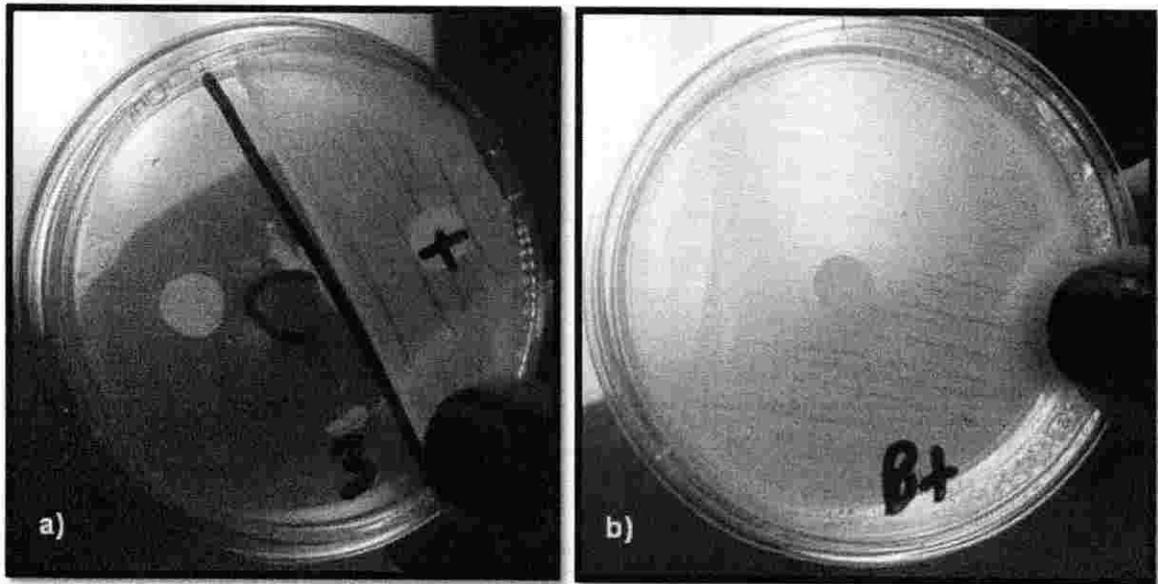


**Figura 9.**-Actividad antibacteriana del extracto metanólico de *R. mangle* L. sobre el crecimiento de *H. pylori* (ATCC 43504).

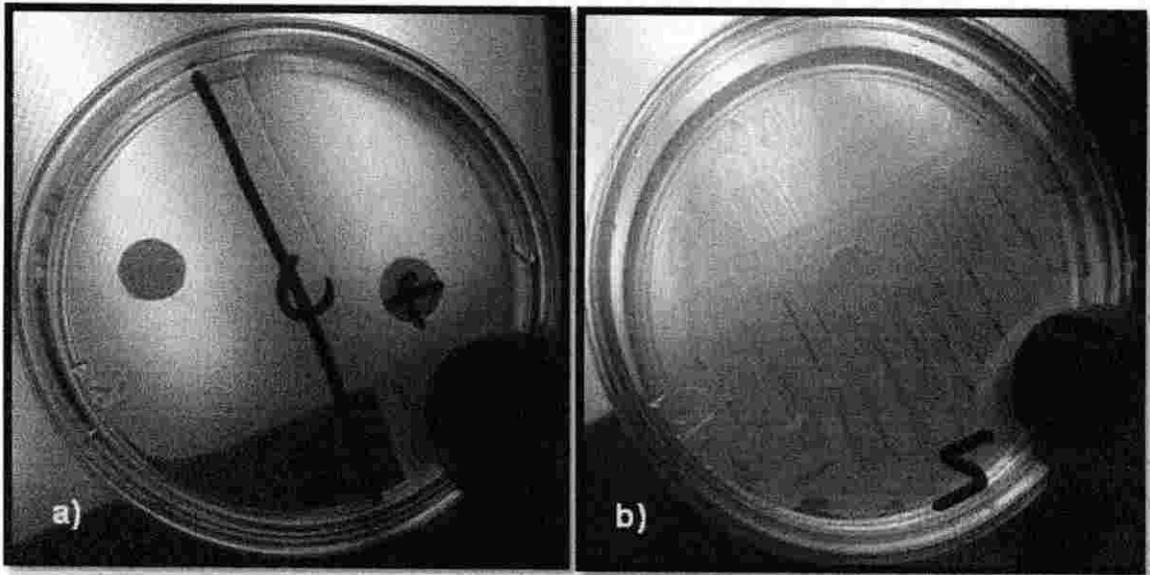
## Evaluación de la Actividad Antibacteriana Mediante Difusión en Disco

La técnica de difusión en disco se realizó para esclarecer los resultados obtenidos mediante el método de microdilución en caldo. La figura 10 muestra los resultados de la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *B. glutinosa*, el control de esterilidad y el control de crecimiento normal. Los resultados cualitativos muestran que este extracto no posee actividad antimicrobiana a esta concentración evaluada que fue de 20.8 µg (Figura 10b). Los mismos resultados se obtuvieron con el extracto metanólico de *H. emoryi*, pues durante la evaluación se observó ausencia total de inhibición (Figura 11b). A diferencia de los resultados anteriores, el extracto de *R. mangle* L. sí mostró inhibición cualitativa del crecimiento de *H. pylori*, pues se presentó un halo de inhibición de 10 mm de diámetro (Figura 12b).

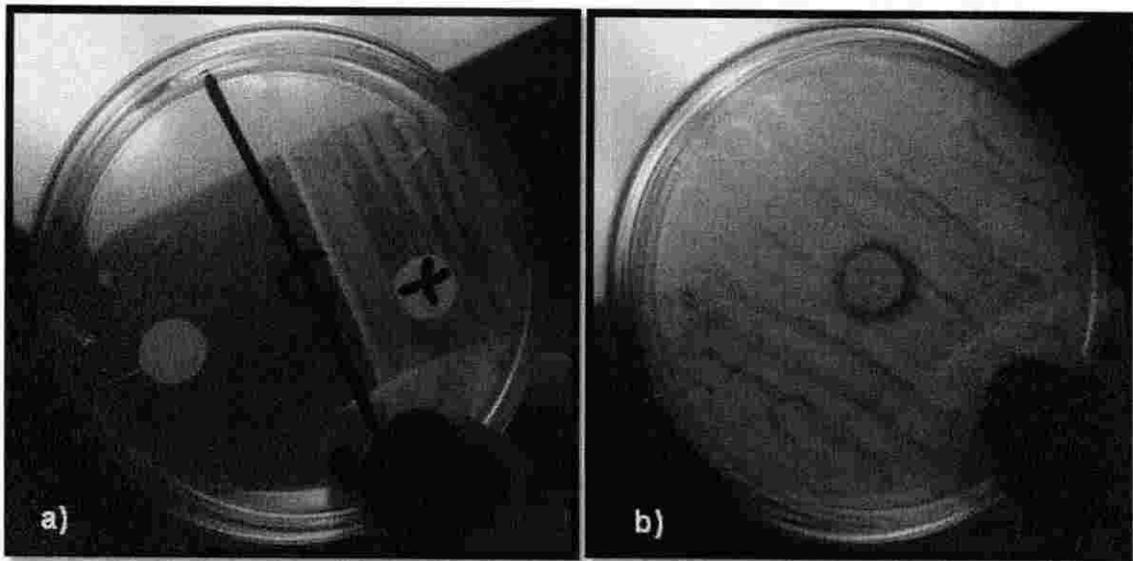
R. 7170023



**Figura 10.-** Efecto inhibitorio del extracto metanólico de *B. glutinosa*. sobre el crecimiento de *H. pylori*. (b); Control de esterilidad (+) y de crecimiento positivo; (a)



**Figura 11.-** Efecto inhibitorio del extracto metanólico de *H. emoryi* sobre el crecimiento de *H. pylori*. (b); Control de esterilidad(+) y de crecimiento positivo; (a)



**Figura 12.-** Efecto inhibitorio del extracto metanólico de *R. mangle* L. sobre el crecimiento de *H. pylori*. (b); Control de esterilidad (+) y de crecimiento positivo; (a)

## DISCUSION

Los resultados del presente trabajo parecen indicar que los extractos metanólicos de *B. glutinosa* y de *H. emoryi* carecen totalmente de actividad antibacteriana en contra de *H. pylori*. Así mismo, la evaluación indica que el extracto metanólico de *R. mangle* L. posee una reducida capacidad antibacteriana. Sin embargo, el análisis de los datos sugiere que los valores de D.O. obtenidos están alterados y no reflejan la verdadera actividad antibacteriana de los extractos. El método de microdilución en caldo standarizado por NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) es un método basado en la medición turbidométrica del crecimiento bacteriano (Cos y cols., 2006), y cualquier factor que altere el origen de esta turbidez puede conducir a una falsa interpretación de los resultados. En el presente estudio, encontramos que existe una irregularidad en las mediciones debido a una interferencia entre los constituyentes de los extractos y los constituyentes del medio de cultivo. Nosotros creemos que durante el ensayo, los valores de D.O. están en función de dos procesos que afectan a la turbidez de manera contraria. En primer lugar, pensamos que los extractos poseen compuestos que inhiben el crecimiento bacteriano, lo cual contribuyen a la disminución de la turbidez. Por otro lado, parece que los extractos poseen compuestos capaces de precipitar de manera inespecífica a los constituyentes del medio, lo cual aumenta la turbidez. El análisis fitiquímico reveló que los extractos dieron positiva la prueba para taninos y polifenoles, compuestos a los cuales se les ha documentado la capacidad de precipitar proteínas inespecíficamente (Scalbert 1991; Isaza 2007; Sher 2009). Así mismo, creemos que otros factores como: la poca solubilidad de los extractos, su tendencia a formar mezclas coloidales, la adición de albumina sérica, la evaporación del medio y la

evaporación del vehículo, contribuyen a la precipitación observada durante los ensayos.

La verdadera actividad antibacteriana de los extractos esta enmascarada dado que las mediciones no arrojan valores de D.O originados por el verdadero crecimiento de *H. pylori*. Si bien, algunos componentes de los extractos precipitan y otros inducen precipitación de las proteínas del medio, el propio crecimiento bacteriano también modifica la turbidez porque algunas células se depositan en el fondo del pozo. Este depósito heterogéneo de células, componentes del medio y componentes del extracto contribuyen a la sobre estimación del crecimiento bacteriano, pues genera valores ambiguos y los alterados de D.O. Algunas investigaciones corroboran nuestras observaciones, y han descrito que los componentes de los extractos pueden interferir con la determinación del efecto antibacteriano mediante los factores anteriormente mencionados (Eloff 1998). Algunos autores han realizado modificaciones al método de Microdilución en caldo, sugiriendo determinar el crecimiento bacteriano mediante ensayos colorimétricos. La medición espectrofotométrica de cromóforos específicos capaces de ser reducidos por el metabolismo bacteriano (MTT, TTC, XTT e INT) ofrece correlaciones más confiables que la medición por turbidometría (Eloff 1998; Gabrielson y cols., 2002; Weseler y cols., 2004; Al-Bakri y Affi 2007;). Sin embargo, también se ha reportado que algunos extractos pueden interferir con estos ensayos, debido a que poseen compuestos químicos capaces de reducir los cromóforos (Eloff 1998; Shoemaker y cols. 2004; Peng y cols. 2005).

El análisis del comportamiento cinético del crecimiento de *H. pylori* bajo el efecto de *B. glutinosa* (figura 7) sugiere que a 200 µg/mL, los valores de D.O. son el resultado conjunto del crecimiento bacteriano y de

la precipitación de los componentes del medio. A 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de extracto, la concentración de los compuestos que inducen precipitación inespecífica parece aumentar, y la D.O. es mayor. Sin embargo, al pasar a los 800 y 1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de extracto, la precipitación compite con la inhibición. En este punto la concentración de los compuestos antibacterianos es lo suficientemente alta para reducir la turbidez originada por crecimiento bacteriano, por lo que la D.O. disminuye. En el caso de *H. emoryi*, la relación positiva entre la concentración del extracto y la D.O parece estar en función de: la relativa insolubilidad del extracto, la formación de partículas coloidales, y una mayor precipitación de las proteínas del medio (figura 8). A la menor concentración evaluada, existe evidencia de actividad antibacteriana. A concentraciones de 400, 800 y 1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  la D.O. probablemente aumenta por que la turbidez originada por la precipitación de los componentes del medio, sobrepasa la inhibición del crecimiento bacteriano que ejercen los compuestos presentes en el extracto.

El análisis del comportamiento cinético de crecimiento de *H. pylori* bajo el efectos del extracto de *R. mangle* L. refuerza nuestros argumentos. Los datos indican que existe una relación negativa entre la D.O. y la concentración del extracto (figura 9). A 1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  el efecto de los compuestos antibacterianos es mayor que el de los compuestos responsables de la precipitación de proteínas, la actividad antibacteriana es evidente. A concentraciones menores, la turbidez aumenta por efecto de la precipitación debido a que los compuestos antimicrobianos ejercen menor efecto (probablemente porque están en menor cantidad), y los valores de D.O. obtenidos se deben a la turbidez originada por la precipitación y por el crecimiento bacteriano. Por otro lado, el análisis de los resultados de la evaluación de la actividad antibacteriana mediante el método de difusión en agar parece corroborar que solo el extracto

metanólico de *R. mangle* L. posee propiedades inhibitorias. Nosotros creemos que la poca solubilidad de los extractos de *B. glutinosa* y *H. emryi*, así como, la baja concentración utilizada para impregnar el sensidisco son los factores responsables de que no se observara inhibición del crecimiento de *H. pylori*.

El estudio fitoquímico se realizó con la finalidad de estimar la naturaleza química de los compuestos responsables de la actividad antibacteriana. Aunque los extractos mostraron poseer un perfil similar, las diferencias en su constitución fitoquímica pueden estar en función de la actividad antibacteriana encontrada. Algunas investigaciones han identificado ciertos compuestos químicos en el género *Baccharis* sp. Se ha reportado la presencia de algunos flavonoides como la quercitina, luteína, y naringenina, a los cuales se les ha documentado su actividad antimicrobiana (Proestos y col., 2005; Pereira y col., 2007). Además, se ha reportado que la actividad antimicrobiana del género está dada por compuestos terpenoides. Derno y cols., 2005 ha reportado actividad antimicrobiana de aceites esenciales de *Baccharis flabellata* contra *S. aureus*. Para *H. emoryi* se ha reportado por Sheth y cols., 1972 actividad anticancerígena, se ha detectado la presencia de ácido betulínico. También se ha reportado por Tanowitz y cols., 1984, la presencia de terpenos antimicrobianos como el alfa-pineno, beta-pineno, y el limoneno (Dai y col., 2013). En el caso de *R. mangle* L. la investigaciones realizadas por Sánchez 2000 han reportado que la mayoría de los constituyentes químicos presentes en el extracto de la corteza son polifenoles. Y que todos los constituyentes químicos aportan en mayor o menor grado efecto inhibitorio del crecimiento de *S. aureus*. Sin embargo, las investigaciones realizadas por Zamora-Alvarez 2014 demostraron que la actividad del extracto metanólico de la corteza se debe a múltiples compuestos.

## CONCLUSIONES

Los métodos empleados para la evaluación de la actividad antibacteriana no permitieron determinar la verdadera capacidad inhibitoria de los extractos metanólicos sobre el crecimiento de *H. pylori*.

De las tres muestras vegetales solo el extracto de *Rhizophora mangle* L. presento actividad antibacteriana en contra de *H. pylori*.

## RECOMENDACIONES

Evaluar de manera cuantitativa la actividad antimicrobiana utilizando el método de dilución en agar, mediante el conteo de las UFC/mL.

## BIBLIOGRAFIA

- Abad M. J. y Bermejo P. (2007). *Baccharis* (Compositae): a review update. *ARKIVOC* 2007 (vii) 76-96.
- Agudo, S., Pérez-Pérez, G., Alarcón, T. y López-Brea, M. (2010). High Prevalence of Clarithromycin-Resistant *Helicobacter pylori* Strains and Risk Factors Associated with Resistance in Madrid, Spain. *Journal of clinical microbiology* 48: (10). 3703–3707
- Annuk H., Hirno S., Tuõ E., Mikelsaar M., Arak E. y Wadstroëm T. (1999). Effect on cell surface hydrophobicity and susceptibility of *Helicobacter pylori* to medicinal plant extracts. *FEMS Microbiology Letters* 172 (1999) 41-45.
- Akiyama H., Fujii K., Yamsaki O., Oono T. y Iwatsuki K. (2001). Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. (48): 487-491.
- Al-Barkri A. G y Affi F. U. (2007). Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. *Journal of Microbiological Methods*. 68.19–25.
- Annuk H., Hirno S., Tuõ E., Mikelsaar M., Arak E. y Wadstroëm T. Bisi-Johnson, M. A., Obi, C.L., Hattori, T., Oshima, T., Li S., Kambizi, L., Eloff, J. y Vasaikar, S. (2011). Evaluation of the antibacterial and anticancer activities of some South African medicinal plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/11/14>.
- Banso, A. 2009. Phytochemical and antibacterial investigation of bark extracts of *Acacia nilotica*. *J Med Plan Res*. 3(2): 82-85.
- Bridge, D. R. y Merrell, D. S. (2013). Polymorphism in the *Helicobacter pylori* CagA and VacA toxins and disease. *Gut Microbes* 4 (2) 101–117.
- Camorlinga, M., Flores, L., Lazcano, E. (2008). Age and Severity of Mucosal Lesions Influence the Performance of Serologic Markers in *Helicobacter pylori*-Associated Gastroduodenal Pathologies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 17(9) 48-57.

- Camorlinga-Ponce, M., Flores-Luna, L., Lazcano-Ponce, E., Herrero, R., Bernal-Sahagún, F., Abdo-Francis, J. M., Aguirre-García, J., Muñoz, N. y Torres, J. (2008). Age and Severity of Mucosal Lesions Influence the Performance of Serologic Markers in *Helicobacter pylori*-Associated Gastroduodenal Pathologies. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 17(9) 2498-2504.
- Cosa P., Arnold J. Vlietinck B., Vanden Berghe D. A y Maesa L. (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro proof-of-concept. *Journal of Ethnopharmacology* 106 (2006) 290-302.
- De Francesco, V., Giorgio, F., Hassan, C., Manes, G., Vannella, L., Panella, C., Ierardi, E., Zullo, A. (2010). Worldwide *H. pylori* Antibiotic Resistance: a Systematic Review. *J Gastrointestin Liver Dis.*19 (4) 409-414.
- Dorer, M. S., Talarico, S. y Salma, N. R. (2009). *Helicobacter pylori*'s Unconventional Role in Health and Disease. *Learning about Disease from H. pylori* 5 (10) 1-6.
- Egwaikhide, P.A., Gimba C.E. 2007. Analysis of the phytochemical content and anti-microbial activity of *Plectranthus glandulosus* whole plant. *Middle-East J Scien Res.* 2 (2-3): 135-138.
- Eloff J. N. (1998). A Sensitive and Quic Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria. *Planta Medica* 64. 711-713.
- Estrada, E., Villarreal, J., Cantú, C., Cabral, I., Scott, L. y Yen, C. (2007). Ethnobotany in the Cumbres de Monterrey National Park, Nuevo León, México. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 3:8 doi: 10.1186/1746-4269-3-8

- Falcão, D. Q. y Menezes, F. S. (2003). Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. *Rev. Bras. Farm.*, 84(3): 69-74.
- Farshad, S., Alborzi, A., Japoni, A., Ranjbar, R., Hosseini, A., Badiee, P., Shahidi, M., Hosseini, M. (2010). Antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* strains isolated from patients in Shiraz, Southern Iran. *World J Gastroentero* 16(45): 5746-5751 ISSN 1007-9327. ISSN 2219-2840.
- Gabrielson J. A., Mark H. B., Jarelóv A., Kuhn I., MacKenzie D. y Mollby R. (2002). Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. *Jurnal of Microbiological Methods* 50 (2002) 63-73.
- Garibay-Orijel, R., Caballero, J., Estrada-Torres, A., y Cifuentes, J. (2007). Understanding cultural significance, the edible mushrooms case. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 3:4 doi:10.1186/1746-4269-3-4.
- Garza, S. y Young, R. (2007). Herbal and Natural Medicines in the Latino Community. *Family Medicine*. 39 (1).
- Graham, D. Y. (2009). Efficient Identification and Evaluation of Effective *Helicobacter pylori* Therapies. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 7(2) 145–148.
- Grande, R., Giulio, M. D., Campi, E., Bartolomeo, S. y Cellini, L. (2010). A model of *Helicobacter pylori* persistence in a case of gastric cancer. *NEW MICROBIOLOGICA* 19 (33) 343-349.
- Gutierrez, B., Cavazza, M. E., Ortiz, D., Correnti, M., Vidal, T., Mégraud, F., Guerram, M. y Álvarez, T. (2008). Seroprevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* en pacientes con Gastritis Crónica, Úlcera Duodenal y Gástrica: Primer estudio de corte retrospectivo.
- Hadacek, F., Bachmann, G., Engelmeier, D. y Chobot, V. (2011). Hormesis and a chemical raison d'être for secondary plant metabolites. *Dose-Response, Formerly Nonlinearity in Biology, Toxicology, and Medicine*. ISSN: 1559-3258. 9:79–116.

- Isaza M. JH. (2007). Taninos o Polifenoles Vegetales. Redalyc. *Scientia Et Tecnologica de Pereira*. Pererira Colombia.(33) 13-18.
- Jones, P.W., Kinghorn D.A. 2006. Extraction of plant secondary metabolites. Ch. 13 methods in biotechnology, vol. 20. *Natural Products Isolation*, 2nd ed. P. 323-351 Totowa, NJ
- Jiali Dai J., Zhu L., Yang L. y Qiu J. (2013). CHEMICAL COMPOSITION, ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF ESSENTIAL OIL FROM WEDELIA PROSTRATA. *EXCLI Journal* 2013;12:479-490–ISSN 1611-2156.
- Jyh-Ming, L., Chi-Yang, C., Wang-Huei, S., Yu-Chi, L. C., San-Chun, C., Ming-Shiang, W. y Jaw-Town, L. (2011). Levofloxacin- and Clarithromycin-Based and Treatment Outcomes after Strains Correlates with Susceptibility Test Genotypic Resistance in *Helicobacter pylori* Therapies. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* 55 (3) 1123–1129.
- Kim, I. J. y Blanke, S. R. (2012). Remodeling the host environment: modulation of the gastric epithelium by the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA). *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2 (37) 1-18.
- Lars, B. L., Goransson, U., Alsmark, C., Weden, C., Backlund, A. (2010). Natural products in modern life science. *Phytochem* 9:279–301 DOI 10.1007/s11101-009-9160-6
- Lopez-Vidal, Y., Ponce-de-Leon, S., Castillo-Rojas, G., Barreto-Zúñiga, R. y Torre-Delgadillo, A. (2008). High Diversity of vacA and cagA *Helicobacter pylori* Genotypes in Patients with and without Gastric Cancer. *Genetics in Gastric Cancer* 3 (12) 1-7.
- Mansour, K., Burucoa, C., Zribi, M., Masmoudi, A., Karoui, S., Kallel, L., Chouaib, S., Matri, S., Fekih, M., Zarrouk, S., Labbene, M., Boubaker, J., Cheikh, I., Hriz, M. B., Siala, N., Ayadi, A., Filali, A., Mami, N. B., Najjar, T, Maherzi, A., Sfar, M. y Fendri C. (2010). Primary resistance to clarithromycin, metronidazole and amoxicillin of *Helicobacter pylori* isolated from Tunisian patients with peptic ulcers and gastritis: a prospective multicentre study. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 9 (22) <http://www.annclinmicrob.com/content/9/1/22>

- Mark Shoemaker M., Cohen I. y Campbell M. (2004). Reduction of MTT by aqueous herbal extracts in the absence of cells. *Journal of Ethnopharmacology* 93 (2004) 381–384.
- McClain, M. S., Shaffer, C. L., Israel, D. A., Peek, R. M. y Cover, T. L. (2009). Genome sequence analysis of *Helicobacter pylori* strains associated with gastric ulceration and gastric cancer. *BMC Genomics* 10 (3) 1-14.
- Nostro A., Cellini L., Di Bartolomeo S., Di Campi e., Grande R., Cannatelli M. A., Marzio L. y Alonzo V. (2005). Antibacterial Effect of Plant Extracts against *Helicobacter pylori*. *Phytother. Res.* 19, 198-202.
- Peng L., Wang B. y Ren P. (2005). Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 45 (2005) 108–111.
- Pereira A. J., Oliveira I., Sousa A., Valenta P., Andrade P. B., Ferreira I. C.F.R., Ferreres F., Bento A., Seabra R. y Estevinho L. (2007). Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food and Chemical Toxicology* 45 (2007) 2287–2295.
- Pitchai, D., Manikkam, R., Rajendran, S. y Pitchai, G. (2010). Database on pharmacophore analysis of active principles, from medicinal plants. *Biomedical Informatics ISSN 0973-2063 0973-8894 Bioinformatics* 5(2): 43-45.
- Posselt, G., Steffen, B. S. y Wessler, S. (2013). The functional interplay of *Helicobacter pylori* factors with gastric epithelial cells induces a multi-step process in pathogenesis. *Cell Communication and Signaling*, 11 (77) 1-14.
- Proestos C., Boziaris I. S., Nychas G-J. E. y M. Komaitis M. (2006). Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry* 95 (2006) 664–671.
- Reyes-Garcia, V. (2010). The relevance of traditional knowledge systems for ethnopharmacological research: theoretical and methodological contributions. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 6:32.

- Rodriguez-Fragoso, L., Reyes-Esparza, J., Burchielb, S., Herrera-Ruiza, D., y Torres, E. (2009). Risks and Benefits of Commonly used Herbal Medicines in México. *Toxicol Appl Pharmacol*. Author manuscript; available in PMC.
- Romo, G. C. y Coria, V. R. (2010). *Helicobacter pylori*, un modelo de bacteria carcinogénica. *Especialidades Médico-Quirúrgicas* 15(4):242-251.
- Ruan, W., Lai, M., Zhou, J. (2006). Anticancer effects of Chinese herbal medicine, science or myth? *Journal of Zhejiang University Science B*. ISSN 1673-1581 (Print); ISSN 1862-1783 (Online) [www.zju.edu.cn/jzus](http://www.zju.edu.cn/jzus)
- Scalbert. A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*.30 (12): 3875-3883.
- Ser A. (2009). Antimicrobial activity of natural products from medicinal plants. *Gomal Journal of Medical Sciences* (7) 1: 72-78.
- Sheth, K., Jolad, S., Wiedhopf, R. and Cole, J. R. (1972), Tumor-inhibitory agent from *Hyptis emoryi* (Labiatae). *J. Pharm. Sci.*, 61: 1819. doi: 10.1002/jps.2600611129.
- Siavoshi, F., Saniee, P., Navid, S., Massarrat, S., Sheykhosslami, A. (2010). Increase in Resistance Rates of *H.pylori* Isolates to Metronidazole and Tetracycline-Comparison of Three 3-Year Studies. *Archives of Iranian Medicine*, 13 (3).
- Stein, M., Ruggiero, P., Rappuoli, R. y Bagnoli, F. (2013). *Helicobacter pylori* CagA: from pathogenic mechanisms to its use as an anti-cancer vaccine. *Frontiers in Immunology*, doi: 10.3389/fimmu.2013.00328
- Sun, Q., Liang, X., Zheng, Q., Gu, W., Liu, W., Xiao S., Lu, H. (2009). Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics from 2000 to 2009 in Shanghai. *World J Gastroenterol*; 16(40): 5118-5121 ISSN 1007-9327. ISSN 2219-2840.
- Tan, S., Noto, J. M., Romero-Gallo, J., Peek, R. M. y Amieva, M. R. (2011). *Helicobacter pylori* Perturbs Iron Trafficking in the Epithelium

to Grow on the Cell Surface. PLoS Pathog 7(5): e1002050.  
doi:10.1371/journal.ppat.1002050.

- Vega, A. E., Cortiñas, T. I., Mattana, C. M., Dilva, H. J. y Pung de Centorbii, O. (2003). Growth of *Helicobacter pylori* in Medium Supplemented with Cyanobacterial Extract. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 41(12) 5384–5388.
- Wenzhen, Y., LiYumin, Quanlin, G., Kehu, Y., Lei, J., Donghai, W., y Lijuan, Y. (2010) Is Antimicrobial Susceptibility Testing Necessary Before First-line Treatment for *Helicobacter pylori* Infection. Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. Inter Med 49: 1103-1109. DOI: 10.2169/internalmedicine.49.3031.
- Weseler A., Geiss. H. K., Saller R. y Reichling J. (2004). A novel colorimetric broth microdilution method to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of antibiotics and essential oils against *Helicobacter pylori*. Pharmzie 60 (2005) 7: 498–502.
- Yang, JC; Lu, CW y Lin, CJ. (2014). Treatment of *Helicobacter pylori* infection: Current status and future concepts. World J Gastroenterol 20(18): 5283-5293
- Zhang, Z., Liu, Z., Zheng, P., Tang F., Yang, P. (2010). Influence of efflux pump inhibitors on the multidrug resistance of *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* 2010 March 14; 16(10): 1279-1284 ISSN 1007-9327nh.