

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central shield with a figure holding a staff and a cross, surrounded by various symbols including a crown, a castle, and a lion. The Latin motto "SICUT ERAS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER CETERAS" is inscribed around the perimeter of the seal.

AISLAMIENTO DE *Helicobacter pylori* E INHIBICIÓN DE LA BACTERIA POR DIEZ EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES UTILIZADAS POPULARMENTE EN EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES GASTROINTESTINALES

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN

MARIA CRISTINA QUINTANA GALINDO

ROSENDA ELIZABETH YAX SUYUC

QUÍMICAS BIÓLOGAS

GUATEMALA, JUNIO DE 2012

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cóbar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. Fausto René Beber García	Vocal IV
Br. Carlos Francisco Porras López	Vocal V

ÍNDICE

Tema	No. Página
1. AMBITO DE LA INVESTIGACIÓN	01
2. RESUMEN	02
3. ANTECEDENTES	04
3.1 Historia	04
3.2 Especies de <i>Helicobacter</i>	04
3.3 Epidemiología	05
3.4 Fisiología y estructura de la bacteria	05
3.5 Patogenia	06
3.6 Manifestaciones clínicas	08
3.6.1 Manifestaciones extragástricas de la infección con <i>Helicobacter pylori</i>	09
3.7 Diagnóstico	09
3.7.1 Histopatología	09
3.7.2 Reacción en cadena de la polimerasa	10
3.7.3 Cultivo	10
3.7.4 Prueba de ureasa en biopsia antral	10
3.7.5 Serología	10
3.7.6 Detección de antígenos en heces	10
3.7.7 Prueba en aire espirado o prueba de aliento	11
3.8 Cultivo microbiológico de muestra de biopsia gástrica	11
3.8.1 Recolección de muestras	11
3.8.2 Cultivo microbiológico de muestras de biopsia gástrica	11
3.8.3 Microaerobiosis	12
3.8.4 Identificación de <i>Helicobacter pylori</i>	12
3.8.4.1 Prueba de ureasa rápida	12
3.9 Tratamiento	13
3.10 Plantas medicinales	14
3.10.1 Generalidades	14
3.10.2 Plantas con acción antimicrobiana	14

3.10.3 Uso popular de plantas alternativas Terapéuticas en Guatemala	15
---	----

Tema	No. Página
3.10.4 Componentes de las plantas y su acción	16
3.10.4.1 Alcaloides	16
3.10.4.2 Flavonoides	17
3.10.4.3 Taninos	17
3.10.4.4 Saponinas o saponósidos	18
3.10.4.5 Mucílagos	19
3.11 Especies de plantas medicinales	19
3.11.1 <i>Tagetes lucida</i> Cav	20
3.11.2 <i>Psidium guajava</i> L.	20
3.11.3 <i>Neurolaena lobata</i> R.	21
3.11.4 <i>Solanun americanum</i> Millar	22
3.11.5 <i>Byrsonima crasifolia</i> HBK	23
3.11.6 <i>Cornutia pyramidata</i> L.	23
3.11.7 <i>Rizophora mangle</i> L.	24
3.11.8 <i>Smilax dominguensis</i> Willd.	25
3.11.9 <i>Quercus crispifolia</i> Trel.	26
3.11.10 <i>Piper aeroginosibacum</i> Trel.	26
4. JUSTIFICACIÓN	27
5. OBJETIVOS	28
6. HIPÓTESIS	29
7. MATERIALES Y MÉTODOS	30
7.1 Universo	30
7.2 Muestra	30
7.3 Recursos	30
7.4 Materiales	31
7.5 Reactivos	32
7.6 Cristalería	32

7.7	Equipo	33
7.8	Medios de cultivo para recuperación de <i>Helicobacter pylori</i>	33
7.9	Microbiológicos	34
7.10	Metodología para obtención de extractos vegetales	34
7.11	Metodología para aislamiento de <i>Helicobacter pylori</i>	35
7.11.1	Obtención de muestra y transporte de muestras	35
7.11.2	Metodología de aislamiento	35
	Tema	No. Página
7.12	Identificación de colonia sospechosa de <i>H. pylori</i>	36
7.13	Observación de los cultivos e identificación del microorganismo.	36
7.13.1	Observación en fresco	36
7.13.2	Tinción de Gram	36
7.13.3	Prueba de ureasa	37
7.13.4	Prueba de catalasa	37
7.14	Mantenimiento de la cepa	37
7.15	Reactivación de cepa	38
7.16	Determinación de concentración Inhibitoria mínima de claritromicina contra <i>H. pylori</i>	38
7.17	Metodología del bioensayo	38
7.18	Metodología para determinación de concentración inhibitoria mínima –CIM-	39
7.19	Diseño experimental	40
7.19.1	Aislamiento	40
7.19.2	Metodología de aislamiento	40
7.19.3	Bioensayo	40
7.19.4	Análisis	40
8.	RESULTADOS	42
8.1	Obtención del extracto	42
8.2	Aislamiento de <i>H. pylori</i>	42
8.3	Estandarización del bioensayo	43

8.4 Determinación de la concentración inhibitoria mínima –CIM-	44
8.5 Creación de cepario <i>H. pylori</i>	45
9. DISCUSIÓN	46
10. CONCLUSIONES	49
11. RECOMENDACIONES	50
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
13. ANEXOS	56

1. AMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

La investigación se realizó dentro de las líneas de la unidad de Bioensayos del departamento de Citohistología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala como parte del proyecto FODECYT 052-2009 “Evaluación de las alternativas de diagnóstico por *H. pylori*. Búsqueda de alternativas para el tratamiento; donde se aisló la bacteria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) proveniente de biopsias gástricas, y se determinó la actividad antimicrobiana e inmunomoduladora de diez extractos de plantas medicinales utilizadas popularmente en Guatemala para el tratamiento de infecciones gastrointestinales.

2. RESUMEN

La bacteria *Helicobacter pylori* es reconocida como el principal agente etiológico de gastritis crónica, úlceras gástricas y duodenales y algunos tipos de cáncer gástrico, por establecer la asociación de la bacteria con dichas enfermedades en los años ochenta los investigadores Barry Marshall y Robin Warren se hicieron acreedores al premio Nobel de Medicina y Fisiología 2005.

H. pylori es un bacilo Gram negativo, catalasa, oxidasa y ureasa positivo, mide de 2,5 a 3,5 nm de largo por 0,5 a 1 nm de diámetro, microaerofílico, curvado o espiral con uno a varios flagelos envainados polares, localizados en uno de los extremos de la bacteria y al menos tres especies tienen fibras periplásmicas. Los estudios epidemiológicos revelan que la infección con *H. pylori* es más común en países en desarrollo que en los desarrollados, debido a diversos factores del ambiente, tales como hacinamiento, disponibilidad de agua potable, nivel económico, contaminación fecal y otros factores del hospedero y del agente como la edad y el tipo de cepa, respectivamente.

Aunque este agente es sensible *in vitro* a muchos antimicrobianos, es difícil de erradicar del estómago, debido a su nicho ácido y su localización extracelular, pues reside en la capa mucosa del estómago y desarrolla resistencia a los antibióticos que usualmente son utilizados para su tratamiento. Esta situación ha llevado a la búsqueda de nuevos compuestos que además de garantizar su control, reduzcan los efectos secundarios (3).

La etnomedicina y el uso de plantas medicinales representan un vasto campo milenario de conocimiento, en el que la búsqueda de extractos de plantas con acciones antibacterianas ha ganado nuevo ímpetu.

El presente trabajo de investigación evaluó el efecto inhibitorio *in vitro* de diez especies de extractos de plantas medicinales, las cuales son utilizadas popularmente para el tratamiento de infecciones gastrointestinales. Dichos extractos fueron probados contra tres aislamientos de *Helicobacter* obtenidas y recuperadas de muestras clínicas, con el

fin de comprobar su acción bactericida y poder proponerlas como una alternativa natural para el control efectivo de ese enteropatógeno.

Para el efecto se llevó a cabo el aislamiento de *H. pylori* de 19 de pacientes a quienes se les obtuvo muestra de biopsia gástrica en el Instituto Nacional de Cancerología INCAN. Se logró la preservación de 12 aislamientos en caldo Brucella, que posteriormente fueron utilizadas para la realización del bioensayo.

La actividad anti *Helicobacter pylori* de los extractos, fue evaluada por el método de dilución en agar base enriquecido con sangre de carnero al 7.5% y suplemento alimenticio Isovitalax, en condiciones de microaerofilia (CampyGen™ Oxoid). Fueron utilizados los aislamientos de los pacientes y se aplicó el ensayo con un total de cinco repeticiones para asegurar un nivel de confianza de $\alpha = 0.05$. Así mismo, el método empleado tuvo validez mediante una curva de actividad dosis/efecto, enfrentando al microorganismo contra diferentes concentraciones de Claritromicina, el antibiótico de elección.

Se encontró actividad inhibitoria significativa ($p < 0.05$) de los extractos etanólicos de *C. pyramidata*, *T. lucida*, *B. crassifolia*, *S. nigrescens* a una concentración inhibitoria mínima de 100 $\mu\text{g/mL}$ y 50 $\mu\text{g/mL}$ para *R. mangle*.

Por lo anterior se recomienda realizar una segunda etapa de la investigación que conduzca al fraccionamiento molecular de los extractos que evidenciaron actividad anti *H. pylori*. Posteriormente, plantear la evaluación *in vivo*.

3. ANTECEDENTES

3.1. Historia

Las primeras observaciones de bacterias espirales en el estómago no son recientes. Ya en el año 1881, Rappin las observó en el estómago de los perros y a comienzos del siglo XX, Krienitz las describió en el estómago de pacientes con cáncer gástrico. A pesar de que algunos autores sugirieron su implicación en la inflamación gástrica como hizo Steer en 1975, el hecho de que no lograran cultivarla implicaba que no podía pasar más que de una hipótesis no demostrable (1).

De ahí radica la importancia del trabajo de Warren y Marshall, quienes no sólo las describieron en biopsias gástricas de pacientes con gastritis y úlcera péptica relacionándola con estas patologías sino que, siguieron la metodología de Skirrow, para el aislamiento de *Campylobacter* y lograron cultivar la bacteria a partir de biopsias de antro gástrico. No contentos con eso y ante la incredulidad con la que la comunidad científica acogió la noticia, decidieron demostrar los postulados de Koch, para lo cual Barry Marshall ingirió una solución con el microorganismo y padeció una gastritis aguda demostrada con datos histológicos (1).

Por el aspecto curvo de la bacteria, sus requerimientos en el cultivo y su localización anatómica fue llamado en un principio *Campylobacter pyloridis*, nombre después corregido para adoptarlo a la forma científica correcta *Campylobacter pylori*. En el año 1989 datos provenientes del estudio de la secuencia 16S ARN ribosomal llevaron a la conclusión de que se trataba de un nuevo género, quedando entonces clasificado *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) (2).

3.2. Especies de *Helicobacter*

Desde la descripción del género, el número de especies incluidas en él ha aumentado espectacularmente. En la actualidad al menos 24 especies de *Helicobacter* han sido descritas de una forma válida y 35 o más *Helicobacter* nuevos esperan ser formalmente nombrados. Una manera útil y práctica de agrupar las especies de *Helicobacter* es hacerlo teniendo en cuenta el nicho que ocupa (3). Este conocimiento inició una revolución en la gastroenterología, pues se considera uno de los hallazgos más

importantes de los últimos tiempos en el área de la microbiología. Esta infección se ha convertido en un serio problema de salud pública debido a su capacidad de producir inflamación crónica de la mucosa gástrica, úlcera gástrica y por ser factor predisponente de cáncer gástrico en la edad adulta. En la actualidad, la comunidad científica ha mostrado un interés creciente en esta bacteria, en virtud de su alta relación con la enfermedad ulcerosa péptica y el cáncer gástrico. Asimismo, a últimas fechas también se la ha relacionado con algunos padecimientos extragástricos (4).

3.3. Epidemiología

Helicobacter pylori es quizá el agente causal responsable de la infección bacteriana crónica más común en el mundo. Se estima que 50% de la población mundial está infectada; sin embargo, existen diferencias según la raza, región, factores genéticos y los niveles socioeconómicos. La infección la padecen principalmente los niños y su incidencia se incrementa con la edad. Algunos estudios sugieren que durante los primeros tres años de vida el núcleo de la infección es el hogar. Se desconoce el modo de transmisión, aunque hay pruebas que sugieren que ésta puede ocurrir de persona a persona, por vía oral-oral o fecal-oral; otros estudios sugieren que la infección puede adquirirse del agua contaminada o por zoonosis. La infección puede iniciarse desde edades muy tempranas y persistir durante toda la vida. En los países industrializados la frecuencia de la infección, en la población menor de 30 años de edad, es del 10%. Sin embargo, en países en vías de desarrollo la frecuencia oscila entre 45 y 90% en la población menor de 10 años de edad. Entre los factores asociados con mayor prevalencia están: el bajo nivel socioeconómico, el hacinamiento, los padres y hermanos infectados, familias numerosas, pobre estado nutricional, condiciones insalubres, como ausencia de agua potable y de letrinas en casa, consumo de vegetales crudos y contacto con borregos, tabaquismo en la madre, asistencia a guarderías y presencia de mascotas en el hogar (5-6).

3.4. Fisiología y estructura de la bacteria

H. pylori es un bacilo Gram negativo flagelado, que coloniza exclusivamente la mucosa gástrica y que posee distintos factores de virulencia que le permiten sobrevivir en el medio ácido gástrico, como la producción de grandes cantidades de ureasa, tiene un peso molecular de 600,000 y un punto isoeléctrico de 5.93, que son las características

más relevantes de esta bacteria y que son fundamentales para su adaptación al estómago. Además, *H. pylori* produce otras enzimas: catalasa, fosfolipasa, proteasa, oxidasa y hemoaglutininas. Este microorganismo crece en medios de cultivo de agar con 1 a 15% de sangre o suero; requiere una concentración de oxígeno de entre 2 y 8% y CO₂ del 7%, crece en un pH de entre 6.6 y 8.4 y a una temperatura entre 33 y 40.5°C. Es microaerófilo con forma espiral y mide de 2.5 a 4 micras de largo por 0.5 a 1 micra de ancho, con extremos romos, cubierta lisa y en uno de ellos exhibe un mechón de 3 a 8 flagelos envainados que le permiten la movilidad. Tiene gran predilección por las uniones epiteliales, ricas en urea y heme. Existen dos cepas de *Helicobacter*: a) tipo I con toxina vacuolante (vac-A) y con antígeno asociado a citotoxinas (cag-A), que predispone a la aparición de úlcera gastroduodenal, por su mayor agresividad, y b) la tipo II que no expresa los anteriores marcadores y se asocia con la existencia de gastritis crónica sin ulceración. El genoma del *H. pylori* cambia continuamente durante la colonización crónica de un individuo mediante la importación de pequeños fragmentos de ADN de otras cepas de *H. pylori* durante infecciones persistentes. La transmisión es por vía fecal-oral u oral-oral, sin desestimar la transmisión iatrogénica por sondas, endoscopios y últimamente ha llamado la atención el potencial de transmisión de la placa dentaria como reservorio del microorganismo. La forma espiralada y la gran movilidad de *H. pylori* le da una supervivencia, como mínimo, de una semana en aguas de río, lo que explicaría la alta incidencia en residentes de áreas marginales y carentes de servicios sanitarios (7).

3.5. Patogenia

Existen diversos factores que influyen en la virulencia y patogenicidad de *H. pylori*, algunos relacionados con el microorganismo y otros con el huésped que juntos, modulan el riesgo de desarrollar la enfermedad. Los factores patogénicos relacionados con la bacteria incluyen:

a) *Motilidad*. Los flagelos son los que le permiten su gran movilidad para introducirse con rapidez en la capa de moco del estómago. Los genes Fla-A y Fla-B se han identificado como reguladores de los flagelos y las cepas que carecen de ellos son incapaces de colonizar (7).

b) *Producción de enzimas*. *H. pylori* produce enzimas que favorecen la enfermedad, como la ureasa de la membrana celular que se excreta activa en el medio que la rodea.

La ureasa desdobla la urea en amonio y CO₂ que neutraliza el ácido gástrico a un pH de 6 a 7. Esta situación protege al microorganismo del ambiente ácido del estómago, lo que le permite atravesar la capa de moco. La ureasa también tiene propiedades citotóxicas; junto con el amonio dañan a la mucosa y proporcionan los nutrientes necesarios a la bacteria para su adhesión al epitelio gástrico y permitiéndole su crecimiento. La producción de mucinasa, fosfatasa alcalina y ácida, gammaglutamiltranspeptidasa, proteasas y lipasas, entre otras, favorece la virulencia y la patogenicidad. La catalasa y la superóxido dismutasa protegen a la bacteria de los metabolitos tóxicos, producto de procesos oxidativos de defensa de los macrófagos y neutrófilos (8)

c) *Citotoxinas*. El 50% de las cepas de *H. pylori* produce una citotoxina vacuolizante, factor importante en la inducción de la enfermedad. Ésta tiene un efecto citopático sobre los cultivos celulares, crea vacuolas en las células epiteliales y ulcera la mucosa superficial (sólo se ha reportado en estudios animales). La totalidad de las cepas de *H. pylori* contiene un gen *vac-A*, pero sólo 50% secretan la citotoxina activa. Todas las cepas productoras de *vac-A* tienen un gen denominado *cag-A*, el cual codifica una proteína de igual denominación, cuya función se desconoce aunque su existencia se relaciona con la producción de la citotoxina vacuolizante capaz de estimular la producción de interleucina 8 (IL-8) y de generar una respuesta humoral específica. La detección del gen *cag A* y la genotipificación del gen *vac A* en cepas de *H. pylori* aisladas en pacientes estudiados puede ser de utilidad como marcador de virulencia y la existencia de uno u otro genotipo tendrá implicaciones importantes en la evolución de la infección (8).

d) *Factores de adherencia*. *H. pylori* sólo infecta a la mucosa gástrica debido al limitado papel de la excreción de la urea y quizá a la expresión de receptores de membrana que le permiten adherirse al epitelio gástrico. La colonización de la mucosa lleva implícita, como paso previo, la capacidad de la bacteria de adherirse al epitelio gástrico, cualidad indispensable para inducir la gastritis. Esta adherencia sucede por la interacción entre las adhesinas bacterianas y los receptores del huésped representados por algunas proteínas de la matriz extracelular. En realidad, los factores patogénicos relacionados con el huésped no se conocen bien; sin embargo, es probable que sean numerosos, que estén interrelacionados y que provocan la lesión. Algunos son inmunológicos y otros están directamente implicados en la alteración de los mecanismos protectores de la integridad de la mucosa (9).

a) *Respuesta inmunológica.* La infección por *H. pylori* desencadena una respuesta humoral y celular, incapaz de eliminar a la bacteria, la cual persiste toda la vida a pesar del infiltrado inflamatorio que aparece en la mucosa y de la producción de anticuerpos (9).

b) *Alteraciones en la función gástrica.* La infección aguda da lugar a un periodo de hipoclorhidria que propicia la colonización por esta bacteria. La infección se acompaña de concentraciones elevadas de gastrina basales posteriores a la estimulación y disminución de los niveles de somatostatina. Por lo tanto, la infección eleva las concentraciones basales de ácido estimuladas por la gastrina. Esto da lugar a una descarga ácida en el duodeno y promueve la metaplasia gástrica y la formación de úlcera duodenal (10).

3.6. Manifestaciones clínicas

Gran cantidad de personas se infecta con *H. pylori*; sin embargo, sólo un mínimo porcentaje desarrolla la enfermedad y tiene complicaciones. Los síntomas iniciales de la enfermedad son muy inespecíficos y triviales, a tal punto que pasan inadvertidos por el enfermo, por ello resulta muy difícil determinar el momento exacto en el que ocurre la infección. En la mayor parte de las veces la infección cursa de manera asintomática y, a pesar de la cantidad de personas que se encuentran colonizadas por *H. pylori*, la proporción de individuos que desarrollan síntomas es sólo del 10 al 20%. Las manifestaciones más comunes son los síntomas abdominales altos, como el dolor retroesternal, dolor en el epigastrio, pirosis, vómito, náuseas, sensación de plenitud y de distensión abdominal, regurgitación y eructos, todos se conocen, generalmente, como dispepsia y tienen relación con la infección con *H. pylori*. En los niños no hay un cuadro clínico específico. El síntoma que refieren con mayor frecuencia es el dolor abdominal ardoroso y recurrente, localizado casi siempre en el epigastrio, que regularmente ocurre cuando el estómago está vacío, entre comidas y las primeras horas de la mañana. En los niños, *Helicobacter pylori* se ha asociado con gastritis antral, aunque su significado clínico es incierto. La úlcera duodenal que se correlaciona con esta bacteria rara vez se observa en niños menores de 10 años de edad. *H. pylori* se ha relacionado con múltiples enfermedades benignas, como gastritis crónica, úlceras duodenales y malignas como el adenocarcinoma gástrico y maltoma (7, 11-12).

3.6.1. Manifestaciones extragástricas de la infección con *Helicobacter pylori*

Hace poco se describieron algunas de las enfermedades extradigestivas relacionadas con la infección con *H. pylori*: enfermedades vasculares como la isquémica coronaria, el accidente vascular cerebral, fenómeno de Raynaud y migraña. Enfermedades dermatológicas como la urticaria crónica y angioedema, rosácea, alopecia areata, dermatitis atópica y púrpura de Henoch-Schönlein. Enfermedades autoinmunitarias como la tiroiditis autoinmunitaria, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide y púrpura trombocitopénica idiopática y otras, como la diabetes mellitus, la encefalopatía hepática, la anemia ferropénica idiopática, el retraso en el crecimiento en niños, poliartritis reactiva con dermografismo y muerte súbita del lactante. Todas estas asociaciones requieren complementarse con más investigaciones que las avalen (7, 13).

3.7. Diagnóstico

El diagnóstico de la infección por *H. pylori* puede realizarse por métodos que no precisan de endoscopia (no invasores), como la prueba del aliento con urea marcada con carbono radiactivo (carbono 13-14), determinación de anticuerpos a través de distintos métodos serológicos en diferentes fluidos (suero, saliva, orina) y la determinación de antígenos de *H. pylori* en heces. Pero la endoscopia digestiva alta es necesaria para determinar el tipo de enfermedad gastroduodenal producida por la bacteria y además permite tomas de biopsia para examen histológico, cultivo microbiológico con estudio de sensibilidad a antibióticos usados en el tratamiento y optativamente la prueba de ureasa rápida, para considerar individualmente a cada paciente según sus factores de riesgo (14).

3.7.1. Histopatología

Realizadas en biopsias de pacientes con gastritis o úlceras pépticas. Independientemente de la tinción utilizada, se observan bacilos curvados localizados en los espacios intercelulares de las glándulas gástricas, principalmente a la altura del antro pilórico. Aunque en casos severos suelen encontrarse grandes cantidades de bacterias, lo recomendable es analizar por lo menos dos biopsias de antro, para reducir las probabilidades de error (15).

3.7.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP)

Recientemente se han introducido nuevas técnicas como la amplificación de ADN bacteriano mediante la reacción en cadena de la polimerasa realizada sobre muestras de mucosa gástrica. Este método, capaz de detectar la presencia del microorganismo en cantidades tan bajas como 10-100 células bacterianas, se muestra como una alternativa diagnóstica prometedora (16).

3.7.3. Cultivo

La muestra ideal para aislar a este agente es la biopsia gástrica a nivel de antro. La combinación de muestras de antro y de cuerpo, y más aún, su maceración previa a la inoculación, aumenta las probabilidades de aislamiento (12). El aislamiento se corrobora mediante un frotis coloreado con la tinción de Gram, utilizando carbol fucsina en vez de safranina. La bacteria se observa como un bacilo Gram negativo, de aspecto curvado en forma de C, con extremos romos (17-18).

3.7.4. Prueba de ureasa en biopsia antral

La prueba se basa en la hidrólisis bacteriana de la urea, con producción de CO₂ y NH₄, con lo cual se eleva el pH, haciendo virar el indicador de incoloro a rojo, lo que pone en evidencia a la bacteria, Constituye el método más rápido en la detección de *H. pylori* sometidos a endoscopia (19).

3.7.5. Serología

La detección de anticuerpos séricos, IgG o IgA, específicos contra *H. pylori* o contra algunas de sus proteínas, brinda otra posibilidad diagnóstica. Ello se basa en los niveles altos de anticuerpos específicos contra esta bacteria, encontrados en los pacientes infectados; los que descienden al erradicarse la bacteria. Por el contrario, los individuos sanos son seronegativos (20).

3.7.6. Detección de antígenos en heces

Es un método prometedor que aporta una sensibilidad cercana al 80% como método diagnóstico, de suma utilidad en niños, pero todavía pendiente de validar como método de control postratamiento. Los elevados costos limitan su uso masivo (14).

3.7.7. Prueba en aire espirado o prueba del aliento (Urea Breath Tests –UBT, por sus siglas en idioma inglés)

Se basa en la actividad de la ureasa bacteriana. Consiste en administrar oralmente al paciente una dosis de urea marcada con C₁₃ (10, 11) o C₁₄ (18), que representa el sustrato para la ureasa bacteriana. Treinta minutos más tarde, si el paciente tiene la bacteria, se detecta el CO₂ marcado con el radioisótopo en su aliento. La ventaja de este método es hacer un diagnóstico no invasivo, sin recurrir a la gastroscopía. Sin embargo, una desventaja es que requiere de equipo complejo y costoso (21-22).

3.8. Cultivo microbiológico de muestras de biopsia gástrica

3.8.1. Recolección de muestras

Uno de los inconvenientes enfrentados es la propia muestra, pues debe trabajarse con biopsias de estómago, idealmente del antro gástrico. Por lo tanto, se trata de un procedimiento invasivo que requiere de una gastroscopía para la toma de la muestra. Esa biopsia debe tomarse directamente de la pinza endoscópica con una aguja estéril, guardando todas las precauciones indicadas de técnica aséptica. La biopsia se coloca en un tubo estéril con una o dos gotas de solución salina estéril, e idealmente debe procesarse lo más pronto posible (inoculándola al lado del paciente) (23).

Se recomienda macerar la muestra para analizarla (inoculación, tinción y prueba de ureasa). Herbrink y col. han ideado una forma práctica para ello. La muestra se recoge en un tubo de 16x100 mm (tipo "vacutainer", de tapón rojo), que actúa como mortero y se macera con un tubo de 13x100 mm, previamente esterilizado por fuera (en autoclave), utilizándolo como pistilo. Con este tubo se inocula la muestra en la placa de agar sangre y se hacen una o dos extensiones en lámina para tinción (23).

3.8.2. Cultivo microbiológico de muestras de biopsia gástrica

Los medios de cultivo empleados comúnmente son agar sangre de carnero al 7.5%, agar chocolate con suplemento Isovitalax o agar yema de huevo con sales de tetrazolium. Ninguno con antibióticos, por lo cual es muy importante la técnica aséptica en la manipulación de la muestra. En el estómago, aparte de *Helicobacter*, bajo condiciones normales no hay microbiota asociada; a excepción de algunos pacientes con metaplasia

intestinal o con cáncer, en donde pueden encontrarse bacterias entéricas colonizando el nicho gástrico alterado (24-25).

3.8.3. Microaerobiosis

Se han descrito una variedad de formas para generar la atmósfera microaerofílica que requiere *Helicobacter*, desde el empleo de jarras para anaerobiosis y sobres generadores tipo GasPak, como el CampyPak que incluye el catalizador y brinda la proporción adecuada de gases. Sin embargo, la forma más empleada es utilizar un sobre generador de anaerobiosis, al que se le remueve el catalizador para que la atmósfera generada sea solo microaerofílica. También existen métodos de evacuación con reemplazo, en los cuales se remueve la atmósfera de la jarra con una bomba de vacío y se repone a partir de un cilindro con la mezcla de gases apropiada (24).

3.8.4. Identificación de *Helicobacter pylori*

Al cabo de 5-6 días de incubación, se observan las colonias. En agar sangre, las colonias son pequeñas (alrededor de 1 mm de diámetro), translúcidas e incoloras. En agar yema de huevo con tetrazolium, las colonias son rojas y contrastan fácilmente con el color amarillo del medio. La observación microscópica de esas colonias revela la presencia de bacilos curvos Gram negativo. Las pruebas bioquímicas positivas para ureasa, oxidasa y catalasa, confirman la identificación de este agente (26-27). Las improntas en portaobjetos que se realizan a partir de la biopsia o de las colonias sospechosas, se pueden teñir con Gram, azul de toluidina o tinción para flagelos de Kodaka (24).

3.8.4.1. Prueba de ureasa rápida

Helicobacter pylori es ureasa positiva, con una reacción extremadamente rápida y fuerte, al grado de que esta prueba constituye una forma de diagnóstico presuntivo cuando se practica directamente al macerado de la biopsia. Existen una serie de pruebas comerciales, cuyo principio es el mismo. Puede utilizarse una solución de urea al 6% con 0,05% de rojo de fenol, el cual actúa como indicador de pH. Esta solución tiene una coloración ligeramente amarillenta a pH 6,0 (25). La prueba consiste en adicionar dos gotas de la solución de urea al tubo con el remanente de la biopsia macerada. Obviamente, esto se realiza después de haber sembrado la muestra y haber preparado

una extensión. En los casos positivos, la solución toma una coloración rosada, casi de inmediato (aunque la lectura final se hace al minuto). También se ha utilizado, como indicador, una mezcla de rojo neutro y azul de bromotimol, lo cual brinda un cambio de color más acentuado en el mismo tiempo de lectura (25). La primera técnica es más simple y una vez que se acostumbra a ver el cambio de color, se hace fácil el diagnóstico presuntivo de la bacteria. Estas pruebas tienen un valor predictivo positivo cercano al 80% y su sensibilidad también es alta, de manera que una reacción positiva generalmente corresponde a infección confirmada por el aislamiento de la bacteria. Sin embargo, el valor predictivo negativo es cercano al 50%, por lo que el resultado de una prueba negativa siempre debe confirmarse con el cultivo u otra prueba, como la observación de bacilos curvados en la extensión de la biopsia (27-29).

3.9. Tratamiento

La infección por *H. pylori* es difícil de erradicar y el éxito del tratamiento requiere la administración de uno o más antimicrobianos. Ninguno de los esquemas terapéuticos que en la actualidad se utilizan para erradicar esta bacteria es por completo efectivo. La finalidad del tratamiento es la erradicación del microorganismo que, si se logra, las posibilidades de reinfección son bajas (30-33).

Cuando se erradica *H. pylori* su reaparición se correlaciona con el recrudecimiento de los síntomas. Esta bacteria es sensible a: amoxicilina, tetraciclina, eritromicina, gentamicina, metronidazol, furazolidona y compuestos de bismuto (32). Los estudios *in vitro* demuestran que estos antibióticos son efectivos; sin embargo, desafortunadamente *in vivo*, debido a la inactivación del antibiótico por el pH del estómago, la aparición de resistencia durante el tratamiento y la pobre penetración de los agentes antimicrobianos en zonas profundas de la mucosa gástrica, hacen necesario utilizar esquemas combinados (34-36).

En la actualidad, sólo tres grupos de fármacos son en verdad eficaces, si se prescriben combinados; entre ellos los inhibidores de la bomba de protones (omeprazol, lanzoprazol y pantoprazol), los compuestos de bismuto (subsalicilato de bismuto, ranitidina, citrato de bismuto) y los antibióticos (amoxicilina, claritromicina, metronidazol, tinidazol y las tetraciclinas). Hoy día sólo se aceptan las pautas que cumplan una serie de criterios, entre ellos, que logren índices de erradicación superiores al 90%, que los

efectos secundarios sean inferiores al 5%, que sean de fácil cumplimiento, que induzcan bajas tasas de resistencia antibiótica, que sean de corta duración (7-10 días) y que sean de bajo costo (32, 35, 37-38). El tratamiento triple es la mejor modalidad si se tiene en cuenta su alta tasa de erradicación, que está entre 90 y 95%. Sin embargo, tiene una serie de inconvenientes, entre ellos la falta de seguimiento por parte de los pacientes, aparición de resistencias y efectos adversos. En este esquema se asocian tres antimicrobianos o dos antimicrobianos y un antisecretor. Con el esquema cuádruple se alcanzan tasas de erradicación que pueden llegar al 97%; sin embargo, tiene los mismos inconvenientes que el tratamiento triple, incrementados por la adición de otro fármaco (35, 37-39).

3.10. Plantas Medicinales

3.10.1. Generalidades

La historia antigua de la botánica está íntimamente relacionada con el interés del hombre por la utilización de materiales vegetales para el tratamiento de las enfermedades humanas. Las crónicas de los egipcios, los griegos y los romanos precristianos, tratan de varios miles de especies vegetales que se utilizaban comúnmente como agentes medicinales (40).

Hoy en día, la mayoría de plantas conservan su significancia histórica como una fuente importante de agentes medicinales, utilizados como modelo para las modificaciones y optimización de la estructura sintética y semisintética de nuevas drogas, para pruebas bioquímicas y/o farmacológicas, y como una fuente de inspiración para la generación de medicina orgánica sintética (40).

3.10.2. Plantas con acción antimicrobiana

El uso de sustancias naturales para el tratamiento de diferentes enfermedades, incluyendo las infecciosas, es un desafío en la medicina y se ofrece como una alternativa, especialmente en aquellos desórdenes para los que los tratamientos convencionales fallan.

El reino vegetal es sin duda el que ofrece mayor variedad de sustancias potencialmente útil para el tratamiento de enfermedades humanas y concretamente en las producidas por microorganismos.

El nacimiento de la quimioterapia a finales del siglo XIX y principios del XX se relaciona con dos figuras clave en el desarrollo de la microbiología: Pasteur y Fleming, cuyos trabajos resultaron fundamentales en el conocimiento de las enfermedades infecciosas y su tratamiento, pero el uso de compuestos obtenidos de plantas data de mucho tiempo atrás. Existen pruebas de que el hombre ha usado las plantas con fines medicinales desde hace 60,000 años (41).

Actualmente existe un gran interés en la investigación de sustancias antimicrobianas de plantas y prueba de ello es que diferentes compañías farmacéuticas centran sus esfuerzos en este campo. Por otro lado, la población está cada vez más interesada en este tipo de “terapias alternativas”, como lo demuestran las cifras crecientes del mercado de medicinas botánicas o herbales en todo el mundo (42).

3.10.3. Uso popular de plantas como alternativas terapéuticas en Guatemala

En Guatemala las plantas medicinales han tenido uso tradicional, situación que se mantiene vigente principalmente en el área rural. Sin embargo, hasta 1976 los estudios científicos sobre el tema eran escasos. Durante 1978-82 se realizaron encuestas etnobotánicas para conocer la flora medicinal del país y establecer un sistema de validación y uso de este recurso agrícola y terapéutico (43).

La detección etnobotánica y bibliográfica demuestran que por lo menos 623 plantas se usan para tratar infecciones en Guatemala. Durante 1987 – 1993 se establecieron los procedimientos y se hicieron investigaciones para determinar la actividad de algunas plantas. Hasta 1996 se había tamizado la actividad de 1,022 extractos de 243 plantas, de las cuales 19.5 % mostró tener actividad contra las bacterias patógenas ensayadas (43).

De 1995 a 1999, el Departamento de Citohistología de la Escuela de Química Biológica recibió equipo, asistencia técnica y capacitación de personal por parte de la Agencia de Cooperación Internacional de Japón (JICA) y la Organización de Estados Americanos (OEA), lo que ha permitido tener las condiciones necesarias para realizar la obtención de extractos vegetales, el cultivo de microorganismos y la aplicación de los respectivos bioensayos para determinar la actividad biocida de plantas de uso etnomédico

frente a diferentes agentes microbianos: bacterias, hongos y protozoarios. De 1999 en adelante, se obtuvo el financiamiento para realizar la investigación de la actividad biocida en plantas provenientes de zonas protegidas: Biosfera Sierra de las Minas, Volcán Tacaná y Parque Nacional Laguna de Lachuá, tanto por bioprospección como por encuestas etnobotánicas (43).

3.10.4. Componentes de las plantas y su acción

Los principios activos de las plantas medicinales son sustancias que la planta ha sintetizado y almacenado en el curso de su crecimiento. Sin embargo, no todos estos productos metabólicos tienen un valor medicinal directamente aprovechable. En todas las especies están presentes al mismo tiempo principios activos y sustancias con poco valor medicinal. Estas últimas, llamadas también de lastre, determinan la eficacia del medicamento vegetal en cuestión al acelerar o hacer más lenta la absorción de los primeros en el organismo, esta es la primera de las peculiaridades de los medicamentos de origen vegetal (44).

Casi siempre en una misma planta existen varios componentes medicinalmente activos, de los cuales uno de ellos, que es el principal, determina las aplicaciones que tendrá la especie en cuestión. Los principios activos no se distribuyen de una manera uniforme por toda la planta. Algunos se concentran preferentemente en flores, otros en hojas o raíces y otros se encuentran con mayor frecuencia en semillas, en frutos o en corteza (45).

El contenido en principios activos de una planta medicinal varía, dependiendo del hábitat, de la recolección y de la preparación. Esto constituye una desventaja pero puede evitarse en gran medida recolectando en la época más adecuada y preparándola con el máximo cuidado. La mayoría de las plantas medicinales desarrollan plenamente su eficacia solo cuando se las emplea por períodos prolongados de tiempo (46).

3.10.4.1. Alcaloides

Son sustancias orgánicas de origen vegetal con una actividad fisiológica muy intensa en dosis pequeñas. Contienen nitrógeno en su molécula y con frecuencia se presentan combinados con ácidos orgánicos o taninos (46).

Se trata, por regla general, de sustancias muy activas, en cierta medida “venenos medicinales”. Todas las plantas que los tienen como principal componente no son por tanto indicadas para una terapia en forma de té. En la industria farmacéutica son utilizados para reforzar la acción curativa de la planta sin destacar por su parte de un modo especial (47).

En la actualidad se conocen más de 4000 alcaloides, aunque su presencia probablemente quede reducida a menos del 10% de las especies botánicas. Su gran actividad exige una gran preocupación en su empleo por causar intoxicaciones en muchas ocasiones mortales (48).

3.10.4.2. Flavonoides

Los flavonoides son otro grupo de metabolitos secundarios ampliamente presentes en las plantas y se les atribuyen propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. Biosintéticamente poseen un origen mixto a partir del ácido shikímico y de acetilcoenzima A vía malonilcoenzima (48).

Se trata de un concepto global aplicado a distintas sustancias que tienen una misma composición química base. Las propiedades físicas y químicas son muy variables por lo que no se puede dar una idea general sobre el efecto que causan. Sin embargo, hay tres acciones características: acción sobre la rotura anormal de los capilares, acción en determinados trastornos cardíacos y circulatorios, y acción antiespasmódica en el tracto digestivo. De todas maneras, no hay duda de que los flavonoides participan activamente en el efecto global causado por la planta medicinal (47-48).

3.10.4.3. Taninos

Son compuestos polifenólicos muy astringentes y de gusto amargo. Se dividen en hidrolizables y condensados. Industrialmente se han utilizado para curtir pieles, al eliminar el agua de las fibras musculares. La importancia de los taninos en el mundo vegetal es su capacidad para proteger a las plantas contra las heridas que sufren y el hecho de que las protegen de los ataques exteriores, bien porque resultan tóxicos para los microorganismos o herbívoros, o porque no son digeribles para estos últimos (48).

Los taninos cumplen una función cicatrizante y hemostática, ya que aceleran la curación de las heridas y ayudan a detener el proceso de sangrado. Son componentes vegetales que están en condiciones de ligar las proteínas de la piel y de la mucosa y transformarlas en sustancias insolubles resistentes (48).

Por su acción astringente, resultan eficaces en el tratamiento de la diarrea, contribuyendo a que el organismo pueda realizar deposiciones más secas. Se consideran antioxidantes por su capacidad para eliminar los radicales libres, previniendo la aparición de numerosas enfermedades degenerativas, entre ellas el cáncer. Así mismo, la función antibacteriana de los taninos se produce fundamentalmente al privar a los microorganismos del medio apropiado para que puedan desarrollarse (48).

En general tienen una acción antidiarréica, antimicrobiana, antifúngica, inhibidora enzimática y antídoto de alcaloides y metales pesados. Aunque su toxicidad es baja en principio, pueden ocasionar intolerancias gástricas y estreñimiento (48).

3.10.4.4. Saponinas o Saponósidos

Las saponinas son glucósidos vegetales caracterizados por producir espuma en el agua cuando se mezclan y se remueven, lo que les ha valido su condición de jabones naturales y ha hecho que algunas plantas como la jabonera (*Saponaria officinalis*) fueran utilizadas como tal desde hace mucho tiempo. Disminuyen la capacidad de absorción de los alimentos en el tubo digestivo, por lo que se han utilizado en regímenes de adelgazamiento y para eliminar las mucosidades bronquiales (46).

Muchas plantas con saponinas poseen también efecto diurético y se las utiliza con frecuencia para las llamadas curas de depuración de la sangre (curas de primavera y de otoño). Son asimismo eficaces contra las impurezas cutáneas y las dolencias reumáticas (46).

Muchas de estas especies curan los edemas y actúan como antiinflamatorias. Las saponinas influyen en las plantas medicinales de un modo decisivo sobre la resorción de otros principios activos vegetales y es muy frecuente que pequeñas cantidades produzcan grandes resultados, sin embargo cuando se ingieren en cantidades superiores a las

permitidas, resultan tóxicas produciendo daños en las mucosas digestivas que se manifiestan en vómitos, dolor de estómago, hemorragias, mareo, úlceras, etc. (48).

El mecanismo de acción de las saponinas consiste en su poder antiATPasa merced al cual modifica este sistema en la membrana, perturbando el transporte de sodio a través de ella (descompensación iónica) (48).

3.10.4.5. Mucílagos

Son sustancias que contienen hidratos de carbono, que se hinchan fuertemente con el agua y que proporcionan un líquido viscoso. Las plantas de este tipo están ampliamente distribuidas en el reino vegetal aunque solamente unas pocas especies contienen la suficiente cantidad de mucílago como para poder ser aprovechadas terapéuticamente. La mejor manera de describir el efecto farmacológico de los mucílagos vegetales es usar la palabra de reducción de la irritación (45).

El mucílago se distribuye en forma de una capa delgada sobre las mucosas, las protege contra las sustancias irritantes locales y actúa como atenuante de la excitación. Las inflamaciones, especialmente las que se producen en las mucosas, disminuyen rápidamente bajo ese efecto protector. El mucílago no es reabsorbido, por lo que su efecto es puramente local. Las plantas que los contienen alivian la tos cuando ésta es desencadenada por estados irritativos en la garganta y la epiglotis. Actúan también como purgantes ligeros porque relajan el contenido intestinal, soltándolo, retienen el agua y se hinchan (45).

3.11. Especies de plantas medicinales

Las diez plantas de estudio seleccionadas tanto por su uso tradicional como antidiarreicas y por su actividad antibacteriana demostrada en otras especies enteropatógenas son: *Tagetes Lucida*, *Psidium guajava*, *Neurolaena lobata*, *Solanum americanum*, *Byrsonima crassifolia*, *Cormutia pyramidata*, *Rhizophora mangle*, *Smilax domingensis*, *Quercus crispifolia* y *Piper aeruginosibacum*.

3.11.1. *Tagetes lucida* Cav. (Asteraceae)

El nombre común de esta planta es Pericón o Yerbanís. Es una hierba perenne aromática, glabra, erecta, de 30-95 cm de alto que se levanta desde una base corta, gruesa y leñosa y está cimosamente ramificada. Sus hojas son opuestas, sésiles, oblongo-lanceolada, puntiagudas, finamente dentadas con numerosas glándulas oleosas. Sus flores amarillas en pequeñas cabezuelas terminales tienen tres brácteas, un receptáculo cilíndrico de 9-10 mm de diámetro con 5-7 filarios tubulados en el ápice. Sus frutos son aquenios de 6-7 mm de largo, estriados con papus escamoso de 3 mm de largo (43).

Es una planta nativa de México a Honduras que crece en bosques de encino y en laderas de 1,000-2,000 msnm. Es abundante en la época lluviosa y desaparece en la época seca (43).

Es usada como infusión de flores y hojas para tratar entre otras, afecciones gastrointestinales como cólico, diarrea, disentería, flatulencia, indigestión, náusea y vómitos. Experimentalmente se ha demostrado su actividad antimicrobiana contra *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *E. coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, y ligeramente activa contra *Neisseria gonorrhoeae*. Se le ha encontrado actividad antifúngica contra *Candida albicans* y contra otras levaduras (44).

Las hojas y las flores contienen aceite esencial, alcaloides, cuaternarios, flavonoides, saponinas, taninos, leucoantocianinas y cumarinas. Se ha identificado a la 7-metoxicumarina (herniarina), como la responsable de su actividad antibacteriana, espasmolítica, diurética y antiinflamatoria (44).

3.11.2. *Psidium guajava* L. (Myrtaceae)

El guayabo es un árbol de follaje persistente que puede alcanzar unos 4-6m de alto, de corteza suave, pubescente, delgada, de color rojo-pardo que desfolia en placas. Sus hojas son opuestas, enteras, elípticas u ovo-lanceoladas, algo coriáceas, de corto pecíolo. El haz es verde oscuro y el envés está recubierto de pelos finos amarillentos. Sus flores son blancas, solitarias o en pequeños grupos, que aparecen en las axilas de

las hojas. Tienen 4-5 pétalos y numerosos estambres. El fruto es una baya redondeada con cáliz persistente. La piel es de color amarilla, carnaza rosada o amarilla, por fuera granular y firme, al centro suave, lleno de pulpa jugosa con muchas semillas de pequeño tamaño (43).

Es una planta nativa de América tropical y se encuentra en bosques húmedos y secos, ya que resiste la sequía y el calor intenso. Es poco exigente en suelos y se adapta a una gran variedad de climas, desde húmedo tropical hasta mediterráneo (43)

La decocción de sus hojas y corteza es usada por vía oral para tratar afecciones gastrointestinales: amebiasis, diarrea, disentería, cólico, dolor de estómago, parasitismo intestinal y vómitos (44).

Experimentalmente se le ha demostrado actividad antibacteriana contra *E. coli*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. typhi*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *S. pneumoniae*. Es inactiva contra *V. cholerae* y contra *N. gonorrhoea* (44).

La composición química de sus hojas y corteza es principalmente taninos, aceite esencial, saponinas, triterpenos, esteroides y flavonoides derivados de quercetina como la guayaverina y la avicularina (44).

3.11.3. *Neurolaena lobata* (L.) R. Br. (Asteraeae)

Su nombre común es Tres Puntas. Es una hierba erecta que alcanza hasta 4 m de altura, poco ramificada, con tallos estriados, surcados y pubescentes. Sus hojas son de pecíolo corto, glabras, alternas, acuminadas o agudas a la base, dentadas. Su inflorescencia es corimboso-paniculada; con cabezuelas numerosas, pediceladas, discoideas. Las corolas son de color anaranjado-amarillas. Sus frutos son aquenios negros, glabros, con papus niseriado, con 30 ó más cerdas, blanco-amarillentos. Es nativa desde el Sur de México hasta Panamá, donde crece como maleza en plantaciones. Se le encuentra en lugares escarpados o a orilla de caminos o ríos, en matorrales húmedos o bosques de encino. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Chiquimula, Escuintla, Izabal, El Petén, El Progreso, Quetzaltenango, Retalhuleu, San Marcos, Santa Rosa y Suchitepéquez (43).

La infusión amarga de sus hojas es administrada por vía oral para el tratamiento de afecciones gastrointestinales como diarrea y cólicos. Se le atribuye propiedades antibiótica, antimalárica, aperitiva, carminativa, espasmolítica, febrífuga, entre otras. Experimentalmente se le ha encontrado actividad antimicrobiana contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *S. aureus*, *S. pyogenes*. Es inactiva contra *S. flexneri* y contra hongos levaduriformes y filamentosos. Ha demostrado una gran actividad antiprotozoaria. Químicamente la planta está compuesta de un principio amargo constituido por sesquiterpenlactonas: neurolenina y lobatina, derivados de timol y once flavonoides: cinco derivados de quercetagenina, cuatro kampferoles y dos luteolinas (43).

3.11.4. *Solanum americanum* Millar (Solanaceae)

Conocida comúnmente como quilete, ésta es una hierba de tallo pubescente que alcanza hasta 1 m de alto. Sus hojas están dispuestas en pares o solitarias, lanceoladas, de ápice agudo que miden 3-14 cm de largo. Posee inflorescencia internodal, racemiforme, pedunculada, con pocas flores. Estas tienen cálices de 1-2 mm, con lóbulos ovalados, agudos; la corola es blanca, tiene el limbo partido y el estilo es más largo que los estambre. Sus frutos son globosos y negros cuando maduran, de unos 4-8 mm de diámetro.

Es una planta nativa de América, que crece en matorrales y sembradíos de 325-1,500 msnm. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Jutiapa, Petén, Retalhuleu, Sacatepéquez, San Marcos, Santa Rosa, Suchitepéquez y Zacapa (43).

Su uso medicinal consiste en el cocimiento de las hojas y semillas administrado por vía oral para afecciones gastrointestinales tales como cólico, diarrea, estreñimiento, gastritis, úlcera péptica. Experimentalmente se le ha demostrado actividad antibacteriana a las hojas de *S. americanum* contra *S. aureus*, *S. pyogenes* y *P. aeruginosa* (43).

Su composición química ha sido poco estudiada, pero se conocen varios alcaloides: solasina, solasonina, glucoalcaloides y alcalinas (43).

3.11.5. *Byrsonima crassifolia* (L.) HBK (Malpighiaceae)

El nance es un árbol de 3-10 m de alto, copa redondeada o extendida, de tronco recto, corteza de color café y rugosa por fuera, color rosado por dentro. Sus hojas son siempre verdes, opuestas, ovaladas o elípticas, puntiagudas, de 5-10 cm de largo. Las flores son de cinco pétalos, de color amarillo o anaranjado, de 1-2 cm de ancho, numerosas y en grupos. Los frutos son drupas carnosas, de 8-22 mm de diámetro, que son portados aisladamente en racimos en número de dos a quince. La piel del fruto es delicada y de color amarillo y la carnaza es blanca, gruesa, jugosa, ácida de olor peculiar. Posee una sola semilla negra y muy dura (44).

La planta es nativa de México a Sudamérica y crece en bosques secos y tropicales hasta una altura de 1,800 msnm. En Guatemala crece en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chiquimula, El Progreso, El Quiché, Escuintla, Huehuetenango, Izabal, Jalapa, Jutiapa, El Petén, Quetzaltenango, Retalhuleu, San Marcos, Santa Rosa, Suchitepéquez y Zacapa (44).

Popularmente es usado el cocimiento de la corteza para el tratamiento de afecciones digestivas como cólico, diarrea, disentería, estreñimiento e indigestión. Experimentalmente se le ha demostrado actividad antimicrobiana, contra *S. typhi*, *S. flexneri*, *V. cholerae*, *E. coli*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. aureus* y vlactonas, galactato de proantocianarias especies de *Candida* (45).

La corteza contiene alto contenido de taninos, ácido oxálico, glucósidos, flavonoides, saponinas, sesquiterpenlactonas, galactato de proantocianidina B2 y triterpenos (45).

3.11.6. *Cornutia pyramidata* L. (Verbenaceae)

Esta planta llamada comúnmente Azulejo o Flor Lila, es un arbusto perenne, nativo de América. Es muy aromático con ramitas e inflorescencias albotomentosas, tetrágona. Sus hojas son aovadas a elípticas y tallos cuadrangulares. Las inflorescencias se presentan en panoja grande, piramidal, pedúnculo tetragonal, con una corola de color azul o morado, tomentosa. El fruto es una drupa. En Guatemala se le conoce como hoja de

zope y se le ha descrito en el departamento de Izabal en el Cerro San Gil, en Escuintla y Alta Verapaz (44).

Son pocos los usos medicinales populares que se reportan de esta planta, pero estudios experimentales del extracto etanólico de sus hojas han demostrado una actividad antimicrobiana contra bacterias enteropatógenas. Su composición química no ha sido investigada todavía (44).

3.11.7. *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae)

Conocido como mangle o candelón, éste es un árbol o arbusto perennifolio, halófito, de 1.5-15 m (hasta 30 m) de altura. Su copa es redondeada formada por hojas opuestas, simples, pecioladas, elípticas a oblongas, aglomeradas en las punas de las ramas, coriáceas, lisas, gruesas; verde oscuras en el haz y amarillentas con puntos negros en el envés. El tronco es recto con las ramas apoyadas en numerosas raíces aéreas de origen adventicio, simples o dicotómicamente ramificadas, con numerosas lenticelas. La corteza externa es de color olivo pálido con manchas grises, pero si se raspa adquiere color rojo. Es inolora, amarga, dura, de textura lisa a rugosa y apariencia fibrosa. La corteza interna es de color rojo intenso y granulosa. Sus inflorescencias son simples, con 2 o 3 flores actinomorfas; sus pétalos son cuatro, no persistentes, de color blanco o amarillentos en la base y moreno rojizos arriba. El fruto es una baya de color pardo, coriácea, dura, piriforme, farinosa de 2-3 cm de largo por 1.5 cm de ancho, con cáliz persistente. Se desarrolla una semilla, rara vez dos por fruto (46).

Es una especie con un amplio patrón de distribución. Se le encuentra a lo largo de las costas del Golfo, el Pacífico y el Caribe. Habita las costas americanas del océano Pacífico en forma continua, desde el sur de Sonora y Baja California hasta Ecuador, incluyendo el Archipiélago Galápagos. En el océano Atlántico, se presenta en forma discontinua desde las costas de Florida hasta Brasil. Se le encuentra en Bermuda y Bahamas, Antillas Mayores y Menores. En América el límite norte de su distribución está casi a los 24 grados Norte en el Pacífico (45).

Entre sus usos medicinales, está el empleo de la corteza, la raíz y las hojas. La corteza es usada como febrífugo, hemostático, antidiarreico, para el asma, hemoptisis,

mordedura o picadura de animales marinos venenosos, diversas heridas, tuberculosis, lepra, hemorragias, disentería, elefantiasis. La hoja es usada para el escorbuto, dolor de muelas, úlceras leprosas y la raspadura de las raíces es usada por los pescadores contra mordeduras de peces y picaduras de insectos venenosos. Experimentalmente, se le ha comprobado actividad antimicrobiana contra bacterias enteropatógenas (45).

La corteza es muy rica en taninos (10-40%) y se emplea machacada y cocida como astringente. La planta tiene efecto anti-hiperglicémico y podría llegar a usarse clínicamente en el control de la diabetes mellitus (46).

3.11.8. *Smilax domingensis* Willd. (Smilacaceae)

La zarzaparrilla es un bejuco leñoso o herbáceo, dicoico, que trepa por zarcillos pareados. Su tallo alcanza usos 15 m o más de largo y hasta 4 cm de diámetro; es glabro, en su porción inferior está provisto de espinas aplanadas, rectas o recurvadas, de 5-12 mm de largo, esparcidas. La porción superior es lisa, cilíndrica e inerme. Las hojas inferiores son ovaladas o elípticas, de unos 14 cm de largo; son de ápice agudo a acuminado, con cinco nervios más o menos conspicuos, los dos exteriores submarginales, lo que contribuye a veces a que el margen se presente algo engrosado. Son coriáceas y tienden a ponerse de color café al secarse. Las inflorescencias masculinas son umbelas, ligeramente aplanadas, de 1-5 mm de largo, están dispuestas en solitario o en ramillas racemiformes bracteadas, cortas. Las umbelas femeninas son solitarias y tienen pedúnculos de 5-8 mm de largo, con pedicelos de 4-7 mm de largo, segmentos del perianto lanceolados, con tres estaminodios. Los frutos maduros son café-rojizos a morado oscuros, de 5-10 mm de diámetro (46).

Se han descrito en el Caribe, México y Centroamérica hasta Panamá. En Guatemala se le encuentra en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Izabal, Zacapa, Escuintla, El Petén, Santa Rosa y Suchitepéquez (46).

La infusión o decocción de la planta se usa para tratar cefalea, estreñimiento, fiebre, infección intestinal, gonorrea, leucorrea, parásitos y cáncer. La decocción de la raíz y el tallo se usa para tratar asma y enfermedades venéreas. El jugo de las hojas se usa contra la disentería y los parásitos. El polvo de la raíz se usa para tratar úlceras

crónicas. Experimentalmente se ha demostrado actividad biocida contra bacterias Gram negativo, Gram positivo, dermatofitos y contra *C. albicans* a los extractos etanólicos y de acetato de etilo, tiene además actividad diurética, antioxidante e inmunomoduladora (43).

Está compuesta químicamente por alcaloides, esteroles insaturados, saponinas, flavonoides, taninos, azúcares y grasas (44).

3.11.9. *Quercus crispifolia* Trel. (Fagaceae)

Esta especie de encino es endémica de México, Guatemala, Honduras y El Salvador. Los miembros de esta especie son árboles que alcanzan más de 3 m de alto. En Guatemala se le ha reportado en alturas de 3,000-3,400 msnm en el Cerro Tená en Totonicapán y la montaña Cajolá en el departamento de Quetzaltenango. Son árboles silvestres, de crecimiento lento, de hojas gruesas coriáceas, obovadas o elípticas, con ápice redondeado. Las flores son numerosas y su fruto es una bellota bienal (48).

Diferentes especies del género *Quercus* son usadas indistintamente con fines medicinales. El cocimiento de su corteza y de las hojas se usa para tratar afecciones gastrointestinales: diarrea, disentería, gastritis, tifoidea y vómitos. Experimentalmente se le ha encontrado actividad antibacteriana potente contra enterobacterias, así como actividad contra levaduras del género *Candida* (46).

La corteza es rica en taninos, las hojas contienen aceite esencial compuesto por cineol, α y β -pinens, p-cimeno, timol y sesquiterpenos; contienen también tanino, alcaloides, resinas y goma (44).

3.11.10. *Pipper aeruginosibacum* Trel. (Piperaceae)

Esta planta pertenece a un género de unas 600-700 especies, aromáticas la mayoría. Esta especie, nativa de la región mesoamericana, colectada en el Parque Nacional Laguna de Lachuá, sin estudios previos según fue constatado en la base de datos de NAPRALERT, ha mostrado tener una potente actividad biocida, tanto para bacterias comunes como para *Mycobacterium smegmatis*, además de ser activa contra *Trypanosoma cruzi* (45).

4. JUSTIFICACIÓN

Helicobacter pylori está implicada en la etiología de diversas patologías graves, principalmente digestivas como gastritis crónica, úlceras gástricas y duodenales, maltoma y cáncer gástrico. La susceptibilidad de contraer la infección por *H. pylori* está asociada a la pobreza, malos hábitos de higiene y en general a un estatus socioeconómico bajo, siendo más alta en los países en vías de desarrollo. Se han propuesto tres posibles rutas para la transmisión de *H. pylori*: feco-oral, oral-oral e iatrogénica. Creyéndose que la vía más común es la feco-oral (5-6).

En Guatemala la infección por *H. pylori* es un problema de salud que se observa con relativa frecuencia, ya que se sabe que el 70% de la población sufre de infecciones gástricas asociada a *H. pylori*. Actualmente es necesario desarrollar un método fácil para el aislamiento de la bacteria, que proporcione un diagnóstico confiable y a la vez que sea rentable para que pueda ser incorporado fácilmente a la rutina de un laboratorio, ya que en Guatemala el aislamiento no se realiza, a causa de las condiciones especiales de crecimiento que requiere esta bacteria.

Las vías terapéuticas para la erradicación de *H. pylori* existentes se convierten cada vez en menos confiables a causa de su inefectividad, reacciones adversas, al elevado costo o a la aparición de cepas resistentes a los antibióticos (34-36). Por otro lado, Guatemala posee una gran diversidad de plantas que son una fuente potencial de opciones terapéuticas, que a través de los años han sido utilizadas popularmente para tratar diversas enfermedades. Actualmente en Guatemala no existen estudios que demuestren la actividad de extractos de plantas contra *H. pylori*, en otros países se ha demostrado el uso de plantas contra la bacteria siendo estudiadas para ser alternativa de tratamiento dentro del régimen terapéutico.

En vista de la necesidad de alternativas para el tratamiento de *H. pylori* y de esa fuente rica en plantas se planteó la búsqueda de actividad contra *H. pylori* en plantas utilizadas popularmente para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, así como en plantas nativas que han mostrado actividad antibacteriana contra otros agentes patógenos entéricos, con el fin de recomendar su uso alternativo para tratar esta infección.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Encontrar la actividad inhibitoria de diez especies de plantas vegetales contra *H. pylori* utilizados popularmente en Guatemala para el tratamiento de inflamación del tracto intestinal por medio de un bioensayo.

5.2 Específicos

- 5.2.1 Establecer la tasa de recuperación de *H. pylori* a partir de biopsias gastrointestinales de pacientes del Instituto de Cancerología “Dr. Bernardo del Valle S.” (INCAN) Unidad de endoscopia.
- 5.2.2 Establecer un procedimiento general y estándar para el procesamiento de muestras para el diagnóstico microbiológico de *H. pylori* mediante cultivo, técnica de ureasa rápida y observación microscópica del frote teñido por el método de Gram modificado.
- 5.2.3 Determinar la actividad inhibitoria de los diez extractos de plantas medicinales utilizados popularmente para el tratamiento de inflamación del tracto intestinal por medio de un bioensayo.
- 5.2.4 Determinar las concentraciones inhibitorias mínimas de los extractos con actividad anti *H. pylori*.
- 5.2.5 Crear un cepario de referencia que sirva para realizar estudios posteriores de la bacteria *H. pylori*.

6. HIPÓTESIS

Al menos uno de los extractos evaluados en el estudio posee actividad contra *H. pylori*.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Universo

Diez especies de plantas nativas de Guatemala

7.2. Muestra

Extractos etanólicos de diez plantas nativas, seleccionadas por su uso en el tratamiento de diarrea, enteritis y/o disentería o por su acción contra bacterias Gram negativo: *T. Lucida* (hoja), *P. guajava* (hoja y corteza), *N. lobata* (hoja), *S. americanum* (hoja), *B. crassifolia* (corteza), *C. pyramidata* (hoja), *R. mangle* (corteza), *S. domingensis* (hoja, fruto, tallo y raíz), *Q. crispifolia* (tallo y hoja) y *P. aeruginosibacum* (hoja).

7.3. Recursos

7.3.1. Humanos

7.3.1.1. Seminaristas

P.C. Maria Cristina Quintana Galindo

Mtra. Rosenda Elizabeth Yax Suyuc

7.3.1.2. Asesora

M.A. Margarita Paz de Ramirez

7.3.1.3. Revisora

M.Sc. Vivian Lucrecia Matta

7.3.2 Institucionales

- Instituto de Cancerología “Dr. Bernardo del Valle S.” (INCAN) Unidad de Endoscopia, Patología y Laboratorio Clínico.
- Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología, Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

- Laboratorio de Investigación de Productos Naturales -LIPRONAT-, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.
- Laboratorio de productos naturales, Farmaya.

7.4. Materiales

- Jarra anaeróbica
- Hielera para transporte de muestras
- Batería para mantener la temperatura en 4 °C
- Cajas de Petri desechables estériles
- Cajas de Petri cuadrilate estériles
- Asas bacteriológicas en argolla de nicromo
- Asas bacteriológicas desechables estériles de 0.001mL
- Espátulas
- Crioviales
- Papel parafilm
- Tubos cónicos plásticos estériles con tapón de rosca de 50 mL
- Filtros 0.10 nm
- Puntas amarillas 10 a 100 μ L estériles
- Puntas azules de 100 a 1000 μ L estériles
- Azas de nicromo
- Palillos de madera
- Pipetas desechables
- Bandejas para tinción
- Soportes para tinción
- Maskintape
- Papel aluminio
- Papel mayordomo
- Papel Kraft
- Algodón
- Bolsas Ziploc
- Jeringas estériles de 10 y 5 mL
- Marcadores indelebles
- Tijeras

7.5. Reactivos

- Medio de transporte Cary Blair
- Solución salina fisiológica estéril
- Sangre de carnero desfibrinada
- Hemoglobina
- Agar base Columbia
- Agar Müeller-Hinton
- Suplemento nutritivo Isovitalax
- Sobres para microarofilia Campygen
- Caldo urea
- Oxidasa
- H₂O₂ al 30%
- Cristal violeta
- Lugol (solución de yodo)
- Alcohol-acetona 1:1
- Carbol fucsina
- Agua desmineralizada no estéril y estéril
- Claritromicina
- Etanol al 50% y 70%
- Isopropanol al 95% y 70%
- Metanol absoluto
- Dimetilfulfóxido (DMSO)
- Estándar de McFarland 3.0
- Caldo Brucella + 15% de glicerol
- Leche descremada estéril
- Medio BHI + 15% de glicerol
- Pastillas efervescentes Alka Seltzer

7.6. Cristalería

- Tubos de ensayo con tapón rosca
- Portaobjetos
- Maceradores

- Erlenmeyer con topón de rosca de 100 mL
- Erlenmeyer de 500 mL
- Frascos con tapón de rosca de 100 y 500 mL
- Pipetas Pasteur
- Goteros
- Balones de destilación
- Balones aforados

7.7. Equipo

- Autoclave
- Campana de flujo laminar
- Campana bacteriológica
- Balanza analítica
- Incubadora
- Refrigeradora
- Congelador a -80°C
- Nitrógeno líquido
- Centrífuga en frío
- Pipetas automáticas
- Estufa
- Microscopio binocular
- Incinerador de asas
- Percolador
- Rotavapor
- Pinzas
- Vortex o agitador

7.8. Medios de cultivo para recuperación de *Helicobacter pylori*

- Agar sangre de carnero (ASC) 7.5% (base Columbia)
- Agar sangre de carnero (ASC) 7.5% (base Columbia), mas Isovitalex
- Agar sangre de carnero (ASC) 5% (base Columbia)

- Agar chocolate, más Isovitalex (hemoglobina, base Columbia)
- Agar Müeller-Hinton al 5% de sangre de carnero
- Agar Müeller-Hinton al 7% de sangre de carnero
- Agar planta base Müeller-Hinton al 5% de sangre de carnero
- Agar planta base Müeller-Hinton al 7.5% de sangre de carnero
- Agar planta sangre de carnero (ASC) 5% (base Columbia)
- Agar planta sangre de carnero (ASC) 7.5% (base Columbia)

7.9. Microbiológicos

Tres aislamientos de *H. pylori* obtenidas a partir de cultivos positivos, proyecto FODECYT 52-2009. Aislamiento A: I-061085; aislamiento B: I-0910106 y aislamiento C: I-1110110.

7.10. Metodología obtención de extractos vegetales

- Se pesó 430.16 g de corteza seca de *Rizophora mangle*.
- Se colocó una porción de algodón en la parte inferior del percolador, a manera de crear un filtro para partículas grandes.
- Se colocó un pedazo circular de papel filtro en el fondo del percolador.
- Se transfirió todo el material al percolador y se cubrió con etanol al 50%.
- Se dejó reposar por 18-24 horas.
- Se recolectó en un erlenmeyer todo el disolvente agregado y se colocó en un balón de destilación de 1,000 mL.
- Se agregó el disolvente recuperado al material de extracción en el percolador (se repitió la operación para obtener el mayor porcentaje de rendimiento posible).
- Se colocó el balón con la muestra y se sujetó con la llave correspondiente y se le estableció una rotación de 50-60% y una temperatura entre 40-60°C.
- Se encendió la bomba de vacío hasta llegar una presión de 300-200 atm, cuantas veces fuese necesario hasta agotar el disolvente.
- Se agregó el disolvente recuperado al percolador que contenía el material vegetal (esta operación se repitió dos veces antes de iniciar la concentración).

- Una vez concentrado el extracto se retiró el balón, y el extracto obtenido se colocó en cristizador de vidrio previamente tarado.
- Se colocó en la desecadora durante 15 días.
- Se verificó la consistencia sólida del extracto y se guardó en frascos se almacenó en refrigeración a 4°C.
- Se calculó el porcentaje de rendimiento del extracto obtenido, 29.5 %.
- El resto de los extractos se obtuvieron mediante la búsqueda en el Banco de Extractos del Departamento de Citohistología de la Facultad de CCQQ y Farmacia, USAC. 9 etanólicos y 1 metanólico (*S. nigrescens*).

7.11. Metodología para aislamiento de *Helicobacter pylori*

7.11.1. Obtención y transporte de muestras

- Se realizó protocolo para el comité de ética del Instituto de Cancerología “Dr. Bernardo del Valle S.” (INCAN).
- Se gestionó permiso necesario para ingreso/egreso de material propio.
- Se obtuvieron biopsias gástricas (gastroenterólogo).
- Se colocó cada biopsia en medio de transporte Cary Blair.
- Se transparon en cadena de frío a 4°C por un lapso máximo de 4 horas.

7.11.2. Metodología de aislamiento

7.11.2.1 Método A

- Se maceró cada biopsia en mortero estéril con 1 mL de solución salina.
- Se agregaron 50µL del material macerado en medio de cultivo (Agar sangre de carnero al 7.5% base Columbia y agar chocolate), y se procedió a estriar para obtener colonias aisladas.
- Se colocó en jarra anaeróbica un máximo de 5 cajas de petri con 2 pastillas de Alka Seltzer para generación de microaerofilia.
- Se incubó a 37°C de 5 a 7 días.
- Se realizó impronta de cada biopsia, se tiñeron con colorante Gram modificado.
- Se agregó muestra macerada en caldo urea.

7.11.2.2 Método B

- Se maceró cada biopsia en mortero estéril con 1 mL de solución salina.
- Se agregaron 50µL del material macerado en medio de cultivo (Agar sangre de carnero al 7.5% base Columbia), y se procedió a estriar para obtener colonias aisladas.
- Se colocó en jarra anaeróbica un máximo de 5 cajas de petri con 2 con sobre para generación de microaerofilia Campygen^{MT} 2.5L, se cerró la jarra en un período máximo de un minuto.
- Se incubó a 37°C de 5 a 7 días.
- Se realizó impronta de cada biopsia, se tiñeron con colorante Gram modificado.
- Se agregó muestra macerada en caldo urea.

7.12. Identificación de colonia sospechosa de *H. pylori*

- Se buscaron colonias pequeñas, ligeramente grises, como gotas de rocío
- A partir de las colonias sospechosas, se realizaron: prueba de oxidasa, catalasa, urea, *Helicobacter pylori* es positivo para las tres pruebas.
- Se realizó tinción de Gram modificado para confirmar la morfología de la bacteria.

7.13. Observación de los cultivos e identificación del microorganismo

- Se examinaron los cultivos al quinto o séptimo día de incubación, y se buscaron colonias pequeñas con apariencia de gotas de rocío.
- Se identificaron las cepas, como se describe a continuación:

7.13.1. Observación en fresco

- Colonias sospechosas gris claro, pequeñas y brillantes, con apariencia de gotas de rocío.

7.13.2. Tinción de Gram

- Sobre un portaobjetos, limpio previamente desengrasado se realizó una impronta agregando 25 µL de material macerado por toda la superficie del portaobjetos.
- Se fijó con calor.

- Se añadió cristal violeta durante 1 minuto.
- Se lavó con agua del grifo.
- Se añadió lugol durante 1 minuto.
- Se decoloró con alcohol-acetona (1:1) durante 5-10 segundos.
- Se lavó con agua del grifo.
- Se añadió carbol fucsina durante 5 minutos.
- Se lavó con agua del grifo.
- Se dejó secar.
- Se visualizó en el microscopio con el objetivo de 100 aumentos utilizando aceite de inmersión.
- Se interpretaron resultados:
 - Gram negativo: Observación de pequeños bacilos curvos en forma de coma de color rosa-rojo lo que las hace característico para identificación de *H. pylori*.
 - Gram positivo: Observación de microorganismos de color azul-violeta (13-14).

7.13.3. Prueba de ureasa

Se inocularon varias colonias del microorganismo en 0,5 ml de caldo urea y se incubaron a temperatura ambiente. Un cambio en el color del medio de naranja tenue a rosa-fucsia se consideró una reacción positiva. La lectura se realizó en un intervalo de tiempo entre 5 minutos y 3 horas.

7.13.4. Prueba de la oxidasa.

Se transfirieron varias colonias a una tira de oxidasa (Microbiology Bactident® Oxidase). Una reacción azul oscura indicó la presencia de la enzima oxidasa.

7.13.5. Prueba de la catalasa

Se inoculó una azada de colonias en una gota de H₂O₂ al 3% depositada en un portaobjetos. Se observó la formación de burbujas lo cual indicó una prueba de catalasa positiva.

7.14. Mantenimiento de la cepa

- A partir de un cultivo confirmado de *H. pylori*, se estió en otro medio de cultivo, en un cuarto de la caja con agar sangre de carnero al 7.5% suplementado con isovitalex.
- Se sembró en forma masiva para obtener el mayor crecimiento posible.
- Se incubó en jarra anaeróbica con sobre Campygen™ 2.5L por 72 horas
- Se recolectó el crecimiento y se realsó utilizando media caja de petri con agar sangre de carnero al 7.5% suplementado con isovitalex.
- Se incubó en jarra anaeróbica con sobre Campygen™ 2.5L por 72 horas.
- Se recolectó todo el crecimiento y se realsó utilizando la caja de petri completa con agar sangre de carnero al 7.5% suplementado con isovitalex.
- Se incubó en jarra anaeróbica con sobre Campygen™ 2.5L por 72 horas
- Se recolectó todo el crecimiento obtenido.
- Se colocó en caldo Brucella con 15% de glicerol, leche descremada o caldo BHI con 15% de glicerol.
- Se almacenó a -80°C.

7.15. Reactivación de las cepas

- Se extrajeron los viales del congelador a – 80°C.
- Se centrifugó en frío los viales con *H. pylori* en caldo Brucella más glicerol al 15% durante 5 minutos a 5,000 rpm.
- Se agregaron 50 µL del precipitado a una caja de agar sangre de carnero al 7.5% base Columbia más suplemento nutritivo Isovitalex.
- Se incubaron las cajas con jarra gas pack con sobre Campygen™ 2.5L a 37°C durante 3 días.
- Se observó crecimiento de colonias con apariencia de gotas de rocío, se realizaron pruebas de identificación microbiológica y bioquímica.
- Se repitió el procedimiento 7.14 hasta la realización de bioensayo o almacenamiento de las cepas.

7.16. Determinación de concentración inhibitoria mínima de Claritromicina contra *H. pylori*

Se determinó a los 3 aislamientos seleccionados, la susceptibilidad a Claritromicina, a una concentración de 0.125 µg/mL (Anexo 1).

7.17. Metodología del Bioensayo

- Se pesó 0.028g de cada extracto y se disolvió en 7 mL de etanol al 50%, concentración 4,000 µg/mL.
- Se agregó a la solución de cada extracto 7 mL de agua desmineralizada estéril, se homogenizó y se filtró dos veces para obtener una concentración de 2,000 µg/mL.
- Se preparó agar planta a una concentración final de 100 µg/mL para cada extracto (1mL de agua destilada estéril + 1mL de extracto + 18 mL de ASC 7.5%).
- Se preparó una suspensión de cada bacteria equivalente a 9×10^8 UFC/mL (estándar de McFarland 3) de las cepas A, B y C.
- Se inocularon cinco estrías de cada aislamiento con asas bacteriológicas calibradas de 0.001mL.
- Se inoculó una asada del estándar de Mc Farland 3 al control positivo (ASC 7.5% + 1mL de Claritromicina 0.125 µg/mL+ 1 mL de agua desmineralizada estéril) y control negativo (ASC 7.5% + 1mL de agua desmineralizada estéril + 1 mL de etanol al 50%).
- Se observaron los resultados después de 6 días de incubación en jarra gas pack con sobre Campygen™ 2.5L a 37°C.
- Interpretación de resultados:
 - a. Presencia de crecimiento: extracto inactivo.
 - b. Ausencia de crecimiento (más del 50%): extracto activo.
 - c. Control positivo: ausencia de crecimiento.
 - d. Control negativo: presencia de crecimiento.

7.18. Metodología para determinación de concentración inhibitoria mínima –CIM-

- Se prepararon medios agar planta (ver inciso 7.16) a las siguientes concentraciones: 100 µg/mL, 50 µg/mL y 25 µg/mL.
- Se inocularon las bacterias a una suspensión de estándar de McFarland No. 3 realizando 5 replicas por cada extracto que demostró actividad contra *H. pylori*. Incluyendo controles positivo y negativo.
- Se leyeron los resultados después de 6 días de incubación en jarra gas pack con sobre Campygen™ 2.5L a 37°C.
- Interpretación de resultados:
 - a. Presencia de crecimiento: extracto inactivo.
 - b. Ausencia de crecimiento (más del 50%): extracto activo.
 - c. Control positivo: ausencia de crecimiento.
 - d. Control negativo: presencia de crecimiento.

7.19. Diseño Experimental

7.19.1. Aislamiento

Muestra por intención, buscando obtener el mayor número de aislamientos posibles.

7.19.2. Metodología de aislamiento

Con las cepas obtenidas, se realizó el procedimiento de ensayo y error donde se evaluó la metodología, y se corrigieron los puntos críticos (o donde se pudieran dar los errores).

7.19.3. Bioensayo

Se probaron los diez extractos para determinar si presentaban o no efecto anti-*Helicobacter pylori*. El ensayo fue binomial (susceptible o resistente). Se prepararon medios agar planta con cada extracto a una concentración conocida (100µg/mL). Se prepararon tres estándares de McFarland 3.0 con los tres aislamientos obtenidos de 3 pacientes y se estriaron al azar sobre el agar. Se realizaron cinco réplicas de cada estría en los 10 extractos, para un nivel de significancia $\alpha = 0.05$ (según la tabla de probabilidad

binomial). El diseño experimental fue totalmente al azar (el orden de los estriados en el agar fue diferente en cada ensayo).

7.19.4. Análisis

7.19.4.1. Prueba de hipótesis binomial:

Ho: $p \leq 0.5$ (no tiene efecto inhibitorio)

Ha: $p > 0.5$ (si tiene efecto inhibitorio)

Con cinco réplicas, para $\alpha = 0.05$, se espera que todas del efecto inhibitorio para rechazar Ho, entonces se concluye que si tiene efecto significativo.

La determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) se realizó a partir de la dilución de los extractos que presentaron actividad en el bioensayo; es decir, los que presentaron por lo menos un 50% de crecimiento. Con lo que se procedió a diluir el extracto por dilución en agar a las concentraciones: 100, 50 y 25 $\mu\text{g/mL}$.

8. RESULTADOS

8.1 Obtención del extracto

De los diez extractos utilizados en el estudio, nueve fueron obtenidos del banco de extractos del Departamento de Citohistología de la Facultad de CCQQ y Farmacia. El único que fue preparado por las autoras del presente trabajo fue el extracto etanólico de *R. mangle* por medio de la técnica de percolación y concentración a baja presión utilizando rotavapor, del cual fue obtenido un porcentaje de rendimiento de 24%.

8.2 Aislamiento de *H. pylori*

Con las dos metodologías utilizadas para el aislamiento de *H. pylori* fueron obtenidos 19 cultivos positivos confirmados por pruebas bioquímicas y microbiológicas a partir de 181 biopsias, observándose que la metodología B fue más efectiva, ya que aplicándola se obtuvo mayor positividad en los cultivos. (Tabla 1) (Anexo 1). El porcentaje de recuperación de cultivos a partir de biopsias gástricas fue de 10.5%.

Tabla 1. Métodos utilizados para aislamiento primario de *H. pylori*.

Condiciones	Método A	Método B
Medio de cultivo	ASC 7.5% base Columbia o Agar chocolate	ASC 7.5% base Columbia más suplemento Isovitalax
Atmósfera	2 pastillas efervescentes	Sobre para generación de microaerofilia Campygen ^{MT}
Microaerofílica		
Tiempo de cultivo	7 días	7 días
No, de cultivos positivos	3	16

Fuente: Datos experimentales
ASC: Agar Sangre de Carnero
BHI: Infusión cerebro corazón

8.3 Estandarización del Bioensayo

8.3.1 Realización de curva de Claritromicina para validar el control positivo

Se estableció una curva de claritromicina, con la cual se determinó que la concentración efectiva contra las cepas de *H. pylori* utilizadas es de 0.125 $\mu\text{g/mL}$ (Anexo 2).

8.3.2 Evaluación de la actividad anti-*H. pylori* de los extractos utilizados

Al utilizar la metodología recomendada por la NCCLS (agar sangre al 5%) no hubo crecimiento, por lo que se modificó el medio de cultivo, obteniéndose crecimiento uniforme en agar planta con sangre de carnero al 7.5% en medio base Columbia, con el cual se realizó el bioensayo (Tabla 2).

Tabla 2. Estandarización de agar planta para la realización del bioensayo

Medio de cultivo			Resultado
AMH ^a	7.5%	sangre de carnero	-
AMH ^a	5%	sangre de carnero	-
ASC ^b	7.5%	sangre de carnero	+++
ASC ^b	5%	sangre de carnero	++

Fuente: Datos experimentales

^aAgar Mueller Hinton

+ Crecimiento escaso ++ Crecimiento regular +++Crecimiento abundante

- Ausencia de crecimiento

Se realizaron cinco repeticiones por ensayo en cada uno de los extractos tanto en la fase de tamizaje como en la determinación de la CIM con las 3 cepas de *H. pylori* mostrando actividad cinco de ellos contra la cepa B, el análisis se hizo por medio de la prueba de hipótesis binomial, la actividad anti-*H. pylori* fue significativa ($p < 0.05$). Para la validez del bioensayo se utilizó como control interno positivo el medio de cultivo con claritromicina a 0.125 $\mu\text{g/mL}$, el cual mostró actividad sobre *H. pylori* y el control negativo, con etanol al 50%, que no mostró ninguna inhibición. El crecimiento de *H. pylori* fue homogéneo y no se encontró contaminación en ninguna de las placas (Tabla 3) (Anexo 3).

Tabla 3. Actividad inhibitoria *in vitro* de 10 extractos contra cepas de *H. pylori*, utilizando la técnica de dilución en agar^a

Especie Vegetal	Parte utilizada	Test de dilución en agar (100 µg/mL)		
		Cepa A	Cepa B	Cepa C
<i>Neurolaena lobata</i>	Hoja	Inactivo	Inactivo	Inactivo
<i>Tagetes lucida</i>	Hoja	Inactivo	Activo ^b	Inactivo
<i>Quercus crispifolia</i>	Hoja	Inactivo	Inactivo	Inactivo
<i>Byrsonima crassifolia</i>	Corteza	Inactivo	Activo ^b	Inactivo
<i>Psidium guajava</i>	Hoja	Inactivo	Inactivo	Inactivo
<i>Piper aeruginosibacum</i>	Hoja	Inactivo	Inactivo	Inactivo
<i>Rhizophora mangle</i>	Corteza	Inactivo	Activo ^b	Inactivo
<i>Smilax domingensis</i>	Raíz	Inactivo	Inactivo	Inactivo
<i>Solanum nigrescens</i> ^a	Hierba	Inactivo	Activo ^b	Inactivo
<i>Cornutia pyramidata</i>	Hoja	Inactivo	Activo ^b	Inactivo

Fuente: Datos experimentales

^a Único extracto etanólico

^b Actividad inhibitoria significativa (p < 0.05)

8.4 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Se determinó la CIM de los extractos con actividad anti-*H.pylori* al tamizaje, de los cuales cuatro mostraron puntos de corte mayor a 100 µg/mL y uno con punto de corte de 50 µg/mL. *R. mangle* fue el que mostró mayor actividad frente a *H. pylori*, lo que permite aceptar la hipótesis planteada (Ver tabla 4) (Anexo 4).

Tabla 4. CIM de extractos que presentaron actividad anti-*H. pylori* contra la cepa B en la fase de tamizaje

Especie Vegetal	CIM		
	(100 ug/mL)	(50 ug/mL)	(25 ug/mL)
<i>Tagetes lucida</i>	Activo	Inactivo	Inactivo
<i>Byrsonima crassifolia</i>	Activo	Inactivo	Inactivo
<i>Solanum nigrescens</i>	Activo	Inactivo	Inactivo
<i>Cornutia pyramidata</i>	Activo	Inactivo	Inactivo
<i>Rizophora mangle</i>	Activo	Activo	Inactivo

Fuente: Datos experimentales

^b Actividad inhibitoria significativa ($p \leq 0.005$)

8.5 Creación de cepario *H. pylori*

Se encuentran almacenadas 12 cepas en caldo Brucella adicionadas con 15% de glicerol a -80°C ya que en la reactivación se observó un mejor crecimiento de las cepas preservadas en caldo en este medio, comparado con leche descremada y caldo BHI.

9. DISCUSIÓN

En este estudio fueron evaluados diez extractos etanólicos de plantas que se utilizan popularmente para afecciones gastrointestinales, dichos extractos se caracterizan por su uso en gastritis crónica y colitis; nueve de estos fueron proporcionados por el banco de extractos del Departamento de Citohistología, y el décimo fue preparado por percolación y concentración en rotavapor. El extracto preparado fue de corteza de *R. mangle* (mangle) el que presentó un rendimiento de 24%, considerado como un buen rendimiento ya que permite captar una buena parte de los metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica de la planta. El alto rendimiento representa también una ventaja en costo-beneficio.

Tanto el medio ASC 7.5% con suplemento nutritivo Isovitalex como el agar chocolate demostraron un crecimiento bacteriano similar, pero se recomienda utilizar ASC 7.5% por la facilidad en la preparación del mismo. Por otro lado, el suplemento Isovitalex adicionó al medio los requerimientos nutricionales esenciales para la bacteria pues se sabe que es clasificada como fastidiosa (12, 17).

De los 181 inóculos obtenidos a partir de biopsia gástrica se logró el aislamiento de 19 cultivos positivos lo que corresponde a un 10.5% de porcentaje recuperación, este número es inferior al número de resultados de pacientes diagnosticados por medio de la patología de biopsia gástrica la cual puede deberse a factores que afectaron el crecimiento óptimo de la bacteria como la utilización de pastillas efervescentes (Alka Seltzer) ya se ha demostrado que se logra generar atmosfera microaerofílica. Se sabe por otros estudios que dicho antiácido colocado en una bolsa plástica pequeña con 15 mL de agua, logra una atmósfera O₂, CO₂ y N₂ similar a la de los sobres comerciales generadores de atmósferas microaerofílica, pero en este estudio el uso Alka Seltzer no tuvo efecto probablemente porque *H. pylori* es un microorganismo con requerimientos de cultivo exigentes. También afectó la contaminación provocada por la misma biopsia gástrica, ya que al atravesar el tracto orofaríngeo pudo adquirir microorganismos colonizantes de estos lugares, lo que se vio reflejado en los aislamientos obtenidos en el cultivo primario. Debido a que este microorganismo es de crecimiento lento, tuvo que incubarse durante 7 días junto con la utilización de medios enriquecidos propicio el

crecimiento de otras bacterias de rápido crecimiento, que ocultaban las colonias de *H. pylori* (50).

Para el bioensayo se utilizó también agar base Columbia, 7.5% de sangre y extracto de planta para obtener una concentración final de 100 µg/mL, debido a que no se obtuvo crecimiento utilizando agar Mueller Hinton con sangre y extracto como recomienda la NCCLS, por lo que se hizo la modificación. También, cabe señalar, que la NCCLS solo hace mención del cálculo para compuestos puros y en ningún momento hace referencia de su uso para extractos de plantas (51).

En este trabajo se analizó la actividad anti-*H. pylori* de extractos polares etanólicos debido a que el modo de preparación tradicional reportado para las plantas utilizadas, es a base de agua. Se examinó el efecto de dichos extractos sobre el crecimiento de *H. pylori* bajo el sistema experimental de dilución en agar. Se compararon 3 cepas diferentes de las cuales 5 extractos mostraron posible actividad anti-*H. pylori*. Es importante hacer notar que las plantas que mostraron actividad (*R. mangle*, *C. pyramidata*, *T. lucida*, *B. crassifolia*, *S. nigrescens*) no tuvieron el mismo comportamiento contra las tres distintas cepas utilizadas para la evaluación de los extractos. Lo anterior puede deberse a diferencias fenotípicas de los aislamientos, características que pueden ser determinantes de patogenicidad y virulencia de cada uno de ellos pues se sabe que los pacientes presentaban patologías gástricas distintas como gastritis crónica, gastritis erosiva y úlcera duodenal esto pudo haber influido en el tipo de cepa de *H. pylori*.

Con el objetivo de utilizar un método comparativo para el cálculo de la concentración mínima inhibitoria (MIC) se tomaron en cuenta las recomendaciones hechas por la NCCLS con las respectivas modificaciones mencionadas anteriormente para el método de dilución en agar, lo cual evidenció que cinco extractos tienen actividad anti-*H. pylori* esto se debe a que los extractos tienen la propiedad de inducir la producción de H₂, O₂ y NO, esto crea un ambiente hostil para la bacteria lo que permite la inhibición de su crecimiento, además los extractos utilizados son ricos en compuestos como flavonoides, taninos y saponinas cuyo mecanismo de acción ejerce un efecto protector contra la mucosa gástrica ya que actúan como antiinflamatorios, antioxidantes, y reducción de la irritación respectivamente (45-48). La actividad anti-*H. pylori* solo se evidenció en un aislamiento que nunca había estado expuesto a tratamiento para la erradicación del

microorganismo, lo que hace probable que se trate de una cepa sensible, por no haber estado expuesta a tratamiento químico o natural.

Se preservaron las cepas aisladas en caldo Brucella con 15% de glicerol ya que este es el medio más recomendable, además se trato de preservar cepas en caldo BHI y en leche descremada, pero el crecimiento en la reactivación fue escaso, el caldo Brucella demostró resultados muy alentadores para la conservación de la bacteria ya que se obtuvo buen crecimiento en todas las reactivaciones realizadas.

Este estudio forma parte de las primeras investigaciones realizadas en Guatemala sobre la actividad de *H. pylori* frente a extractos de plantas, proporcionando resultados interesantes, demostrando que 5 plantas tuvieron actividad *in vitro* contra la bacteria. Aún no se obtienen suficientes datos sobre estas plantas en otros países, pero se sabe que durante los últimos 6 años destacan las evaluaciones de especies originarias de Irán, Taiwán, China, Italia, Pakistán, Camerún y México entre otros (52-60). Probablemente los principios activos presentes en algunos de los extractos evaluados, no tienen actividad sobre los diferentes componentes y la estructura de esta bacteria, por tal razón la actividad inhibitoria *in vitro* de 5 plantas resultó negativa.

En nuestro país, existe una amplia variedad de especies vegetales medicinales y de las cuales un importante porcentaje se utilizan popularmente para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, no se habían realizado evaluaciones para la identificación de especies medicinales que pudieran constituir fuentes de nuevos agentes para el combate de la infección de *H. pylori*, por lo que es necesario continuar investigando sobre la actividad terapéutica que pueden proporcionar.

10. CONCLUSIONES

1. De los diez extractos de plantas analizadas cinco (*R. mangle*, *C. pyramidata*, *T. lucida*, *B. crassifolia*, *S. nigrescens*) mostraron actividad significativa ($p \leq 0.05$) contra *H. pylori* por método de dilución en agar.
2. La tasa de recuperación de *H. pylori* a partir de biopsias gastrointestinales fue de 10.5%.
3. Solamente un aislamiento de biopsia gástrica mostró susceptibilidad a los extractos etanólicos posiblemente pertenezca a un paciente que no ha sido expuesto a antibióticos contra infecciones gastro intestinales, por lo tanto la cepa colonizante no presenta resistencia a antibacterianos.
4. El rango de concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos activos fue de 50-100 $\mu\text{g/ml}$
5. Es necesaria la comprobación de la actividad anti-*H. pylori* de las plantas mediante estudios *in vivo* para evidenciar efectividad de los extractos utilizados y para comprobar si las concentraciones obtenidas *in vitro* son las mismas *in vivo*.
6. Se logró crear un cepario con 7 cepas de *H. pylori* para poder realizar estudios posteriores de la bacteria.

11. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios de cultivo microbiológico de biopsias gástricas a pacientes con reincidencia de infección, para lograr estandarizar e implementar una metodología para pruebas de susceptibilidad con las drogas utilizadas para el tratamiento convencional.
2. Continuar con la búsqueda de actividad bactericida contra *H. pylori*, en plantas de uso popular y nativas de Guatemala que no hayan sido evaluadas.
3. Realizar una segunda etapa de la investigación que conduzca al fraccionamiento molecular de los extractos que evidenciaron actividad anti-*H. pylori*.
4. Evaluar el efecto *in vivo* de las infusiones acuosas de las plantas que evidenciaron actividad anti-*H. pylori* en pacientes que no han recibido tratamiento convencional.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Solnick JV, Shauer DB. Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clin Microbio Rev* 2001;14:59-97.
2. Nurnberg M, *et al.* Do conventional cleaning and disinfections techniques avoid the risk of endoscopic *Helicobacter pylori* transmission. *Endoscopy* 2003;35:295-9.
3. Anzures López B. *Helicobacter pylori*. *Revista del Hospital General de México* 2001;64:199-200.
4. Garza E, *et al.* Papel de los polimorfismos de algunas citocinas en el cáncer gástrico en México. Resultados Preliminares. *Rev Gastroenterol Mex* 2003;68:107-12.
5. Torres J. Aspectos epidemiológicos y clínicos de la infección por *Helicobacter pylori* en niños. *Rev Gastroenterol Mex* 2000;65(2):13-19.
6. González J, *et al.* *Helicobacter pylori* y enfermedad. *Rev. Alergia México* 2004;51(6):218-25
7. Hernández R. Detección de los genes de virulencia de *Helicobacter pylori* aislada de biopsias de pacientes de cáncer de estómago. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación) 2005.
8. Gancz H. *et al.* Sodium chloride affects *Helicobacter pylori* growth and gene expression. *J Bacteriol* 2008 (Jun); 190: 4100–4105
9. Sari YS. *et al.* *Helicobacter pylori*: Treatment for the patient only or the whole family?. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1244-1247.
10. Moncayo JI, Santacruz JJ. Detección del gen *cagA* y tipificación del gen *vacA* en cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de pacientes con enfermedad ulcero-péptica en Risaralda. *MEDUNAB* 2000;3(8):69-75.
11. Yahav J. Susceptibility-guided vs empiric retreatment of *Helicobacter pylori* infection after treatment failure. *Dig Dis Sci* 2006; Nov.
12. Solnick JV. Acquisition of *Helicobacter pylori* infection in Rhesus Macaques is most consistent with oral-oral transmission. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3799-3803.
13. Pérez GI. *et al.* Transient and Persistent *Helicobacter pylori* Colonization in Native American Children. *J Clin Microbiol* 2003 (Jun); 41: 2401-2407

14. Plummer M. *et al.* *Helicobacter pylori* and stomach cancer: A Case-Control study in Venezuela. *Cancer Epidemiol, Biomark & Prevent* 2000; 9:961-965.
15. Mandado S. *et al.* Diagnóstico morfológico de *Helicobacter pylori* mediante citología gástrica por cepillado. *Rev Cubana Med* 2003;42:27-33.
16. Montecucco, C. and de Bernard, M. Molecular and cellular mechanisms of action of the vacuolating cytotoxin (VacA) and neutrophil-activating protein (HP-NAP) virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Microbes Infect.* Vol.5, 2003. 715–721.
17. Lijerón Y, *et al.* Pesquisa del *Helicobacter pylori* en enfermedades gastroduodenales agudas y crónicas. *Revista Inst Med Sucre* 2001;66:118-9.
18. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* Infection. *N Engl J Med* 2002;347:1175-86.
19. Weeks, D.L. *et al.* A HC-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science* 2000;287: 482–485
20. Bernasconi, N.L. *et al.* Maintenance of serological memory by polyclonal activation of B cells. *Science* 2002;298: 2199–2202
21. Sánchez E, *et al.* Optimización de la prueba de la urea marcada para la detección de *Helicobacter pylori* en pacientes con dispepsia. *Rev Invest Clin*1995;47: 109-16.
22. Rivas TF, Hernández F. *Helicobacter pylori*: factores de virulencia, patología y diagnóstico. *Rev Biomed* 2000;11:187- 205.
23. Herbrink P, Dorn Lj. Serological methods for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and monitoring of eradication therapy. *Eur J. Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:164-173.
24. Murray P, *et al.* *Campylobacter y Helicobacter*. 4ed. Madrid: Mosby; 2004. p. 289-90
25. Loza E. *et al.* Procedimientos en Microbiología Clínica, Seguridad en el Laboratorio de Microbiología Clínica, Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Madrid 2000.
26. Montecucco C. and Rappuoli R. A. Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001;2:457-466
27. American Gastroenterological Association. American Gastroenterological Association medical position statement: Evaluation of dyspepsia; *Gastroenterology* 2005, November;129(5):1756-1780

28. Hunt-R. Will eradication of *Helicobacter pylori* Infection influence the risk of gastric cancer. Am Jnl of Medicine; 2004; 117/5/S1:86-91, [Pubmed-Medline PMID 15478858](#)
29. Fresnadillo M. *et al.* Comparative evaluation of selective and nonselective media for primary isolation of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies. Helicobacter 1997;2:36-39.
30. MacKay WG. *et al.* Culturing *Helicobacter pylori* from clinical specimens: review of microbiologic methods. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2003; 36:616-622.
31. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* Infection. N Engl J Med 2002;347:1175-86.
32. GonzálezM, Concepción L. *Helicobacter pylori* y dispepsia, un problema de salud comunitario. Rev Cubana Med Gen Integr 2002;3:207-12.
33. López Y, Rangel MS, Calva JJ. Resistencia a antimicrobianos de *Helicobacter pylori* en un Centro de Referencia Infectológico. Rev Invest Clin 1998;50:19-24.
34. Di Silvio M. *et al.* La prueba de aliento como método diagnóstico no invasivo en la infección por *Helicobacter pylori*. Rev Gastroenterol Mex 1998;63:135-42.
35. Boixeda D, Martínde C. Tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. Información terapéutica del Sistema Nacional de Salud 2000;24:141-6
36. Padrón N, Fernández E. *Helicobacter pylori* y enfermedad péptica ulcerosa. Rev Cubana Med Gen Integr 1998;14:619- 27.
37. Walsh JH, Peterson WL. The treatment of *Helicobacter pylori* infection in the management of peptic ulcer disease. N Engl J Med 1995;333:984-91.
38. Sanjurjo JL. *et al.* Eficacia y seguridad entre diferentes dosis de nitazoxanida + subcitrato de bismuto + lanzoprazol para la erradicación de *Helicobacter pylori*. Revista Médica del Hospital General de México 1999; 62:172-5.
39. Piñol F, Paniagua M. Cáncer gástrico: Factores de riesgo. Rev Cubana de Oncol 1998;14:171-9.
40. Villatoro EM. Etnomedicina en Guatemala. Volumen 1. Guatemala: USAC, 1984. 316p. Kinghorn D., Balandrin M. Human Medicinal Agents from Plants. Segunda ed. Washington DC: American Chemical Society, 1993. 356p. (p.2-11).
41. Domingo D & M López-Brea. Plantas con acción antimicrobiana. Rev Esp Quimioterap. 2003;16(4):385-393.

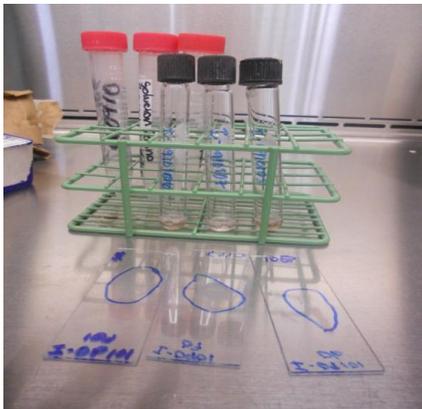
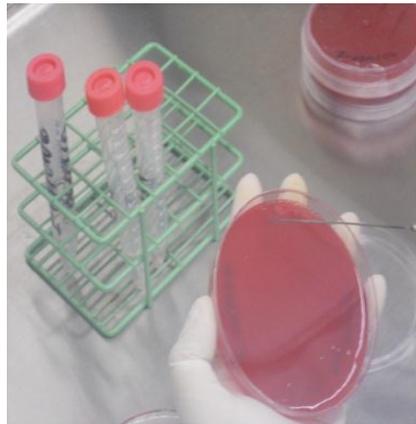
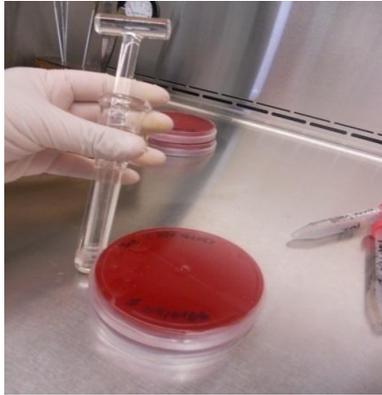
42. Gadhi CA. *et al.* Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Aristolochia pauciner6is* Pomel extracts Journal of Ethnopharmacology 75 (2001) 203–205
43. Cáceres A & LM Girón. Etnomedicina en Guatemala. Guatemala. CEFOL, 1984. pp.283
44. Paz AM. Búsqueda de actividad contra especies de *Campylobacter jejuni* en plantas nativas de Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de maestría, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Facultad de Agronomía). 2005. 62p.
45. Cáceres A. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Editorial Universitaria, USAC, Guatemala, 1999. 402p.
46. Del Cid NE *et al.* Tamizaje de la actividad antimicrobiana de 37 especies vegetales en el tratamiento de infecciones en Guatemala. XIII Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina. Rev Cubana Plant Med, 2004 10 (5):405.
47. *Rhizophora mangle*. Disponible en : http://www.conabio.go.mx/conocimiento/info_especies/arboles/
48. Morton J. Atlas of Medicinal Plants of Middle America, Bahamas to Yucatán. Charles Thomas Publ. USA, 1981.
49. Aguilar H. Actividad anti-*H. pylori* de extractos de plantas medicinales mexicanas utilizadas para trastornos digestivos. Universidad Autonoma metropolitana de Iztapalapa (tesis de graduación) 2007.
50. Hernández C. F., Rivera P. 2003. Experiencia en el Cultivo de Bacterias Microaerófilas: *Helicobacter*. Publicación N° 06. Disponible desde internet en: <http://www.ucr.ac.cr/gacetapc/Helicobacter.cultivo.html>
51. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 16TH International Supplement Clinical and Laboratory. Standards Institute NC-S16. Documento M100-S15-CLSI-NCCLS, Volumen 31:Número 2,011.
52. Nariman, F., Eftekhari, F., Habibi, Z. & Falsafi, T. Anti-*Helicobacter pylori* activities of six Iranian plants. *Helicobacter* 9, 146-151 (2004).
53. Wang, Y.C. & Huang, T.L. Screening of anti-*Helicobacter pylori* herbs deriving from Taiwanese folk medicinal plants. *FEMS Immunol. Med. Microb.* 43, 295-300 (2005).
54. Nostro, A. *et al.* Antibacterial effect of plant extracts against *Helicobacter pylori*. *Phytother. Res.* 19, 198-202 (2005).

55. Ndip, R.N. *et al.* *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of extracts of selected medicinal plants from North West Cameroon. *J. Ethnopharmacol.* 114, 452-457 (2007).
56. Zaidi, S. F. *et al.* Bactericidal activity of medicinal plants, employed for treatment of gastrointestinal ailments, against *Helicobacter pylori*. *J. Ethnopharmacol.* 121, 286-291 (2009).
57. Atapor, M. *et al.* *In vitro* susceptibility of the Gram negative bacterium *Helicobacter pylori* extracts of Iranian medicinal plants. *Pharm. Biol.* 47, 77-80 (2009).
58. Ankli, A. *et al.* Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. *J. Ethnopharmacol.* 79, 43-52 (2002).
59. Castillo-Juárez, I., Rivero-Cruz, F., Celis, H. & Romero, I. Anti- *Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. *J. Ethnopharmacol.* 114, 72-77 (2007).
60. Castillo-Juárez, I. *et al.* Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *J. Ethnopharmacol.* 122, 402-405 (2009).

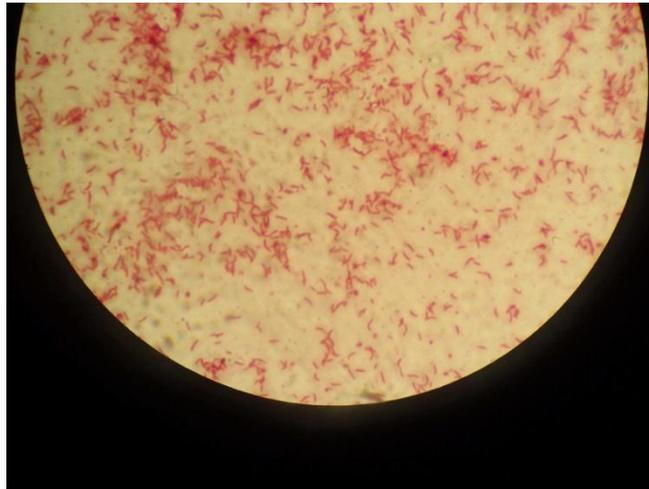
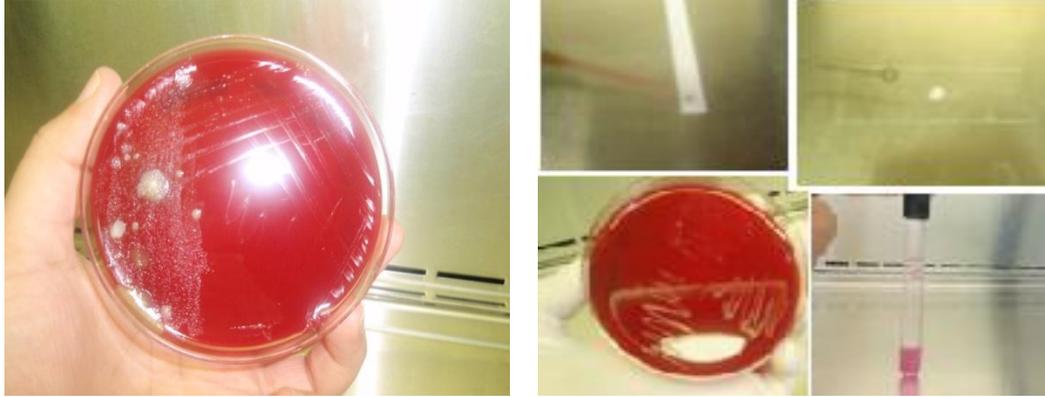
13. ANEXOS

ANEXO 1. Cultivo *Helicobacter pylori*

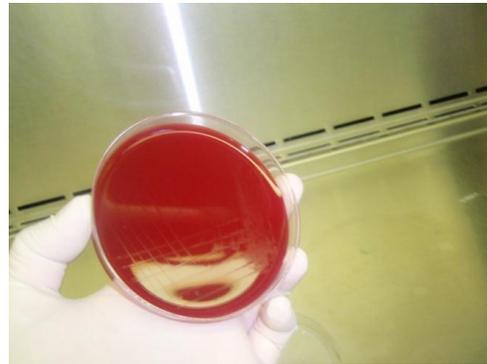
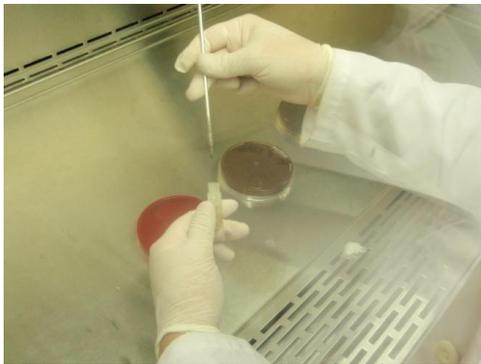
- a. Método para procesar biopsias gástricas para aislamiento de *H. pylori*, prueba de urea y preparación de impronta para tinción de Gram.



- b. Identificación de colonias sospechosas de *H. pylori* para la determinación de cultivo positivo. (Enzimas oxidasa, catalasa y ureasa: positivo, tinción de Gram)



- c. Preservación y reactivación.



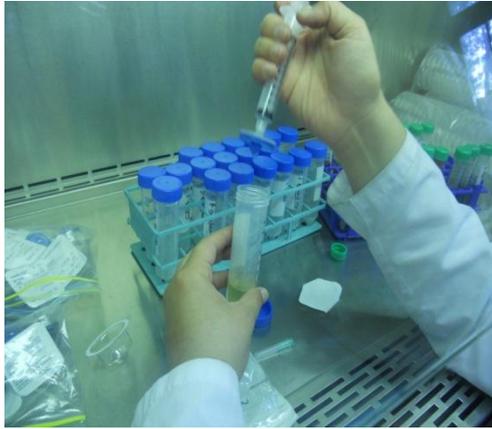
ANEXO 2. Determinación de concentración de Claritromicina para inhibir las cepas de *H. pylori* : 0.125 $\mu\text{g}/\text{dL}$.

Concentración $\mu\text{g}/\text{mL}$	Resultado obtenido
32	Crecimiento
16	Crecimiento
8	Crecimiento
4	Crecimiento
2	Crecimiento
1	Crecimiento
0.5	Crecimiento
0.25	Crecimiento
0.125	Escaso crecimiento
0.0625	No crecimiento
0.03125	No crecimiento

Fuente: Datos experimentales

ANEXO 3. Método de dilución en agar para evaluar actividad anti *Helicobacter pylori*.





ANEXO 4. Determinación de CIM de extractos que mostraron actividad anti-*H. pylori*

