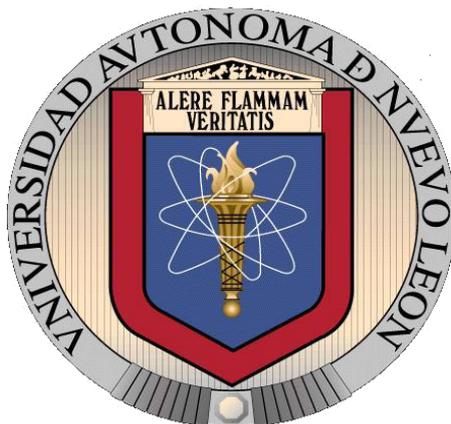


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS
 DERIVADOS DE PLANTAS DE LA FAMILIA *Agavaceae*
 CON EFECTO ANTIMICROBIANO SOBRE *Helicobacter pylori***

Por

MEC GRACIELA GONZÁLEZ CANTÚ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
con acentuación en Química de Productos Naturales**

Mayo 2014

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS
 DERIVADOS DE PLANTAS DE LA FAMILIA *Agavaceae* CON EFECTO
 ANTIMICROBIANO SOBRE *Helicobacter pylori***

Comité de Tesis

Presidente: Dra. Azucena Oranday Cárdenas

Secretario: Dra. Catalina Rivas Morales

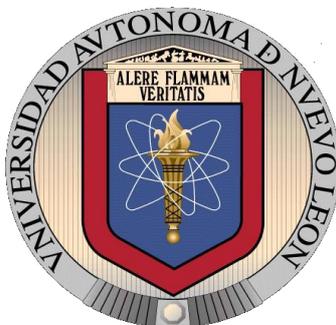
Vocal: Dra. Elvira Garza González

Vocal: Dra. María Julia Verde Star

Vocal: Dra. María Eufemia Morales Rubio

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS
DERIVADOS DE PLANTAS DE LA FAMILIA *Agavaceae* CON EFECTO
ANTIMICROBIANO SOBRE *Helicobacter pylori***

Por

MEC GRACIELA GONZÁLEZ CANTÚ

Como requisito parcial para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

con acentuación en QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES

Este trabajo de investigación fue realizado en los Laboratorios de Química Orgánica y Química Analítica del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL y en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Medicina de la UANL, bajo la dirección de:

Dra. Azucena Oranday Cárdenas
Director Interno

Dra. Elvira Garza González
Director Externo

IN MEMORIAM

A mí hijo

“Los niños, dicen lo que hacen, los viejos lo que hicieron, los tontos lo que harán, sólo los sabios se quedan en silencio”...

*Luis Carlos Hernández González
12/10/1991 - 12/05/2007*

A mí Padre

“Hija, cuando tomes una decisión, sigue hacia adelante, sin mirar para atrás, como el buey en el arado que va derecho abriendo surcos, si gira un poco la cabeza, chuecos serán los surcos en la tierra que ara, así tú, derecha por la vida, sin mirar para atrás”...

*Martín González Ruíz
29/07/1923 - 24/09/2001*

Ningún sufrimiento aquí en la Tierra se compara con la Gloria que nos espera, cumples tu Misión, Dios te llama... tus buenas obras se quedan.

*Me abrieron el camino para llegar a Dios, y si se fueron,
yo también voy...*

Los Amo!!!

DEDICATORIA

A Mi Madre por haberme dado la vida, por todo tu amor incondicional, por brindarme siempre tu cuidado y protección, por darme tu apoyo en todo momento, por preocuparte por mi bienestar, por escucharme, por guiarme, por comprenderme, por ser mi más grande ejemplo de fortaleza en los momentos tan difíciles que he tenido que pasar, mi testimonio para no bajar los brazos, por haber sido la abuelita que cuidó siempre con mucho amor a mi hijo, dicen que es más Madre la que cría que la que engendra.

Este triunfo es para tí.

Te amo Madre.

Gracias por existir!!!

A mis hermanos, Memo, Martín y Juan, por su cariño y apoyo, por ser buenos hijos, buenos esposos, buenos padres, buenos hermanos, buenos tíos, por no dejarme sola, por ser mi mejor ejemplo. Y como detrás de un gran hombre hay una gran mujer, esta dedicatoria también va para mis cuñadas, Sílvia, Luz Elena y Celina que de una u otra manera siempre han estado pendientes, gracias por su apoyo, y por supuesto a mis sobrinos, Clau,

Alé y Memo, Martín, Gus y Juan, y Cely y Jocy.

Gracias por todo Familia!!!

*Lo importante en la vida no es el triunfo,
sino la lucha.*

*Lo esencial no es haber vencido,
sino haber luchado bien.*

(Pierre de Coubertin)

AGRADECIMIENTOS

A Dios por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón en los momentos difíciles y de prueba para seguir adelante y no desmayar, enseñándome a encarar las adversidades y no desfallecer en el intento, por iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante el desarrollo de esta tesis. Gracias Dios por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida.

Muy especialmente quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Ma. Julia Verde Star, quien en el momento más difícil, triste y doloroso de mi vida, me abrió las puertas y me alentó para seguir adelante, por haberme animado a realizar estudios de doctorado, por orientarme en todos los momentos que necesité sus consejos, sin duda fundamental para poder equilibrar la balanza personal y profesional, por infundirme cariño y serenidad, sin su ayuda y su interés, esta tesis difícilmente habría llegado a concluirse. Muchas gracias Doctora, que Dios la bendiga siempre.

A mi Directora de Tesis, Dra. Azucena Oranday Cárdenas, mi más amplio agradecimiento por haber confiado en mí, por su enorme paciencia ante mi inconsistencia, por su valiosa dirección, por su pragmatismo con el que abordó cada una de las distintas etapas de la investigación, por su presencia incondicional, sus apreciados y relevantes aportes, críticas, comentarios y sugerencias y por su apoyo para seguir este camino y llegar a la conclusión del mismo. Su experiencia y conducción han sido mi fuente de motivación, mi guía espiritual y de comprensión.

A la Dra. Elvira Garza González, mi Co-Directora de Tesis, quien es un ejemplo de una combinación de saberes y disposiciones, de un modo singular de transmisión de conocimientos, gracias por la inspiración y el ejemplo intelectual, por su constante y paciente seguimiento y asistencia compartiendo su tiempo de manera generosa durante el desarrollo del presente trabajo.

A la Dra. Catalina Rivas Morales por el apoyo y la confianza que me ha brindado, por todas sus aportaciones y asesorías, por sus conocimientos, paciencia, dedicación, así como también por el interés y motivación para la realización de esta tesis, le reconozco todas las enseñanzas que recibí y sus contribuciones que hicieron posible la culminación de la misma.

A la Dra. María Eufemia Morales Rubio por brindarme su apoyo, compañerismo, ayuda, por compartir conmigo sus conocimientos y por su colaboración en la revisión de esta tesis.

Hago extensivo mi agradecimiento al Dr. Juan Manuel Alcocer González por permitirme continuar con mi labor como docente en la Facultad de Ciencias Biológicas y por la confianza depositada en mí en la impartición de asignaturas a nivel licenciatura.

A los profesores del Departamento de Química por facilitarme la integración en el Departamento y hacerme sentir una compañera durante estos años de desarrollo de mi tesis.

Al Maestro Sergio por todas sus atenciones en el Laboratorio de Química Analítica, por transmitir sus conocimientos de fitoquímica y por su gran disposición para ayudar invirtiendo muchas horas de su tiempo en la realización de las cromatografías, para obtener fracciones, siendo esto una parte fundamental para lograr los objetivos de esta tesis.

A Lucy y Carlos del Laboratorio de Microbiología del Centro Regional del Control de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Medicina por toda su ayuda facilitando el material necesario para llevar a cabo las resiembras de la bacteria.

Al Dr. Moisés Franco Molina por la realización del ensayo de citotoxicidad en el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas.

Al Dr. Víctor Torres de la Cruz por su disposición e importante colaboración para la identificación del compuesto por métodos espectroscópicos del Laboratorio de Proteómica, Departamento de Genética de la Facultad de Medicina.

A mis compañeros y amigos de estudios de Posgrado, mis “fitolocos”, Magda, Angelitos, Aldo, Rolando e Isvar, porque a pesar de la diferencia de edades, me brindaron su compañía, apoyo, ánimo y compartieron conmigo momentos muy agradables durante el desarrollo de esta tesis.

A Hilda Muñiz y Carlos Mireles también por compartir conmigo largas horas de estudio, desveladas hasta el amanecer haciendo tareas, por su compañía en momentos buenos y malos, por hacerme sentir que la diferencia de edades no existe al brindarme su amistad, gracias Hilda, por ser una gran persona y sobre todo una gran amiga, por estar siempre pendiente de mí procurando que esta amistad perdure y con la que sé que podré contar siempre.

A Norita, secretaria del Departamento de Química, a la Sra. Juany y Sra. Marthita, auxiliares de los laboratorios de Química Orgánica y de Química Inorgánica y a la Sra. Rosy, por brindarme su compañía, por todas sus atenciones, por su confianza y por aceptarme como una compañera más de trabajo.

A mis amigas, Adriana (“Güerita”), Esme, Norita, Susy, Nancy (“Gordita”), que siempre han estado conmigo tendiéndome su mano amiga, juntas hemos vivido momentos buenos y no tan buenos, altas y bajas, compartiendo éxitos, pero también momentos tristes y dolorosos, y ahí estamos echándonos porras unas a otras, nos enojamos, nos contentamos, reímos, lloramos, nos desvelamos con nuestras siempre amenas charlas, convivimos en familia, gracias por todos estos años juntas y estoy segura que así seguiremos, venga lo que venga. “Güerita” finalmente y gracias a Dios terminé, gracias por estar siempre al pendiente preguntándome constantemente que como iba con mi tesis.

Mi Gratitude para Mona, Myrna Hernández, Mine, Myrna Madrigal, Liz, Sandra, Grisel y Mary, Mamis de Fer, Mely y May, Gary, Dulce y Ale, Leo, Mariell, Aarón y Fanny, amigos de *Luis Carlos (QEPD)*, con los que compartió una gran parte de su vida, gracias a ellas por la amistad que me han brindado, por su apoyo y ánimo para seguir adelante, por su compañía y el tiempo que me dedican tratando de distraerme, por las merienditas y jugadas a la lotería, por las nohécitas de café, gracias porque sé que el recuerdo de mi hijo está presente.

A mis amigas de Generación, Fina, Raquel, Lupita, Mago, Angélica, Maru, Elma Laura, por brindarme su compañía, apoyo, ánimo y tiempo para convivir.

Al Dr. Arturo Espinoza Mata, por ser un gran amigo desde que realizamos juntos nuestra Tesis de Licenciatura, por su apoyo incondicional, por escucharme y aconsejarme, por brindarme su ayuda cuando más la necesitaba, por ser una persona con la que puedo contar siempre, por el cariño que me brinda y los ánimos que me da, por su gran sentido del humor con el que logra hacerme reír, por darme un espacio en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos a donde yo podía correr cuando me sentía muy sola y triste, porque con sólo estar ahí me daba mucha paz. Especialmente por el regalo que me dio al convertirme en la Madrina de Alex, su hijo menor y quien ahora es para mí un aliciente más en mi vida, pero sobre todo mi agradecimiento a Emma, a esa gran mujer, su esposa, por permitir que esta amistad perdure. Gracias por todo “Compadres”.

A Blanca Sylvia Hernández Cantú, quien es como una hermana para mí, amigas desde niñas, con quien yo puedo desahogar todas mis penas, porque siempre está ahí para escucharme cuando la necesito, para llorar, pero también para compartir momentos de felicidad, gracias porque a través de tantos años y a pesar de tantas cosas, seguimos juntas, a veces un poquito distanciadas, pero siempre al pendiente, gracias por haber sido Tía de mi hijo y por quererlo mucho, por apoyarme, por darme ánimo, por todo lo que haces por mi Madre y también por regañarme. Te agradezco por todo y sé que pase lo que pase seguiremos juntas.

Quise dejar para el final un agradecimiento muy especial para unas personitas a quienes quiero mucho, los amigos de mi hijo, que por ser un gran número, no puedo aquí nombrar a todos, pero que saben que desde lo más profundo de mi corazón les estoy eternamente agradecida por no dejarme sola, por permitirme ser parte de sus vidas, por aceptarme como una “Segunda Madre”, por darme ánimo, apoyo y alegría, porque me han dado la fortaleza para seguir adelante, porque en su compañía las cosas malas se transforman en buenas, la tristeza se transforma en alegría y la soledad no existe. Llegaron conmigo muy pequeños, de 13 a 15 años, y hoy se han convertido en unos jóvenes que están concluyendo o ya concluyeron sus estudios de Licenciatura, lo cual me llena de mucho orgullo. Gracias Omar, Aarón, Carlos, Ramiro, Brandon, Guevara, Vaquero, los cuates, Érika, Jessy, Danny, Nancy, Marleny, ésta niña que sí que me hace sentir que aún soy madre al compartir conmigo muchos momentos muy especiales que me llenan de satisfacción y que sé que lo hace para compensar en cierta forma la ausencia de mi único hijo, muchas gracias Marleny. Muchísimas gracias a Todos!!!

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología: No. Becario 256694, por la beca otorgada para la realización de este trabajo de investigación.

Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Departamento de Química: Laboratorios de Química Orgánica y Química Analítica

Al Programa PAICyT de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por el apoyo financiero al proyecto de investigación: CN660-11

Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	i
LISTA DE TABLAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
NOMENCLATURA	xv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS	3
3. OBJETIVOS	4
3.1 Objetivo general	4
3.2 Objetivos particulares	4
4. ANTECEDENTES	5
4.1 Aspectos históricos y descubrimiento de <i>Helicobacter pylori</i>	7
4.2 Microbiología	7
4.2.1 Características morfológicas	7
4.3 Enfermedades asociadas a <i>H. pylori</i>	8
4.3.1 Infección por <i>H. pylori</i>	8
4.3.2 Infección aguda	8
4.3.3 Gastritis crónica superficial	9
4.3.4 Gastritis crónica atrófica	9
4.3.5 Úlcera péptica	10
4.3.6 Metaplasia intestinal	11
4.3.7 Displasia epitelial gástrica	12
4.3.8 Cáncer gástrico	12
4.4 Patogénesis	15
4.4.1 Componentes de patogenicidad	15
4.4.2 Componentes de virulencia	16
4.5 Prevalencia mundial de la infección	17
4.6 Prevalencia y distribución geográfica de <i>H. pylori</i> y su relación con la mortalidad por cáncer gástrico en México	21

4.7	Métodos diagnósticos para la detección de la infección por <i>H. pylori</i>	25
4.7.1	Cultivo	26
4.7.2	Pruebas bioquímicas	26
4.7.3	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	27
4.7.4	Prueba rápida de la ureasa	28
4.7.5	Prueba del aliento (Urea Breath Test, UBT)	30
4.7.6	Serología	31
4.8	Tratamiento	32
4.9	Causas del fracaso de las terapias	33
4.10	Los Productos Naturales	35
4.10.1	Metabolismo	35
4.10.2	Clasificación de los metabolitos secundarios	39
4.10.2.1	Terpenos	39
4.10.2.2	Compuestos Fenólicos	44
4.10.2.3	Alcaloides	47
4.10.2.4	Glicósidos	48
4.11	Importancia de los productos naturales en el desarrollo de fármacos	55
4.12	Técnicas para la extracción, purificación y caracterización estructural de compuestos	58
4.12.1	Cromatografía	59
4.12.2	Espectroscopia Infrarroja (IR)	60
4.12.4	Espectrometría de Masas	62
4.13	Ensayos de citotoxicidad <i>in vitro</i>	64
4.14	Plantas con actividad anti- <i>Helicobacter pylori</i>	66
4.15	Agaves	68
4.15.1	El género agave	71
4.16	Descripción de plantas estudiadas	73
4.16.1	<i>Agave lechuguilla</i>	73
4.16.2	<i>Agave lophantha</i>	74
4.16.3	<i>Agave victoria reginae</i>	75
5.	MATERIAL Y MÉTODOS	77
5.1	Material biológico	77
5.2	Colecta e identificación del material vegetal	77
5.3	Obtención de los extractos metanólicos	77
5.4	Pruebas químicas para la determinación de grupos funcionales	78
5.5	Pruebas de evaluación antibacteriana de los extractos metanólicos sobre <i>H. pylori</i>	82
5.5.1	Activación de la cepa	82
5.5.2	Preparación de los extractos	82
5.5.3	Preparación del antibiótico	83
5.5.4	Preparación del inóculo	83
5.5.5	Pruebas de evaluación antibacteriana	83
5.6	Separación de compuestos de los extractos metanólicos activos	84
5.6.1	<i>A. lechuguilla</i>	84
5.6.1.1	Pruebas para saponinas	85
5.6.2	<i>A. lophantha</i>	86

5.6.2.1 Cromatografía en columna	86
5.6.2.2 Extracción de saponinas de las fracciones obtenidas en cromatografía en columna	87
5.7 Evaluación de la actividad de las saponinas obtenidas de los extractos metanólicos de <i>A. lechuguilla</i> y <i>A. lophantha</i> contra <i>H. pylori</i>	88
5.8 Evaluación de citotoxicidad de las saponinas	88
5.8.1 Técnica de Azul de Tripano con células sanguíneas mononucleares	88
5.8.2 Viabilidad celular, Técnica MTT	89
5.9 Identificación de la saponina por métodos espectroscópicos	90
6. RESULTADOS	92
6.1 Colecta e identificación del material vegetal	92
6.2 Obtención de los extractos metanólicos	92
6.3 Pruebas químicas para la determinación de grupos funcionales	93
6.4 Pruebas de evaluación antibacteriana de los extractos metanólicos sobre <i>H. pylori</i>	94
6.5 Separación de compuestos de los extractos metanólicos activos	95
6.5.1 <i>A. lechuguilla</i>	95
6.5.1.1 Pruebas para identificar saponinas	96
6.5.2 <i>A. lophantha</i>	98
6.5.2.1 Cromatografía en columna	98
6.5.2.2 Extracción de saponinas de las fracciones obtenidas en cromatografía en columna	101
6.6 Evaluación de la actividad de las saponinas obtenidas de los extractos metanólicos de <i>A. lechuguilla</i> y <i>A. lophantha</i> contra <i>H. pylori</i>	101
6.7 Citotoxicidad de la saponina de <i>A. lechuguilla</i>	102
6.7.1 Efecto de la saponina de <i>A. lechuguilla</i> en células PBMC (células mononucleares de sangre periférica, “ <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> ”)	102
6.8 Identificación del compuesto activo	104
7. DISCUSIÓN	107
8. CONCLUSIONES	115
9. LITERATURA CITADA	116

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Rendimiento de los extractos metanólicos obtenidos	92
II	Grupos funcionales y metabolitos secundarios presentes en los extractos metanólicos obtenidos	93
III	Actividad antibacteriana de los extractos metanólicos frente a <i>H. pylori</i>	95
IV	Eluentes utilizados en cromatografía en columna del extracto metanólico de <i>A. lophantha</i>	99
V	Pruebas realizadas para la identificación de saponinas en el crudo del extracto metanólico de <i>A. lophantha</i>	101
VI	Actividad inhibitoria de las saponinas obtenidas de <i>A. lechuguilla</i> y <i>A. lophantha</i> frente a <i>H. pylori</i>	102

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Evolución natural para la infección por <i>H. pylori</i>	14
2	Variación geográfica de la prevalencia de <i>H. pylori</i> alrededor del mundo	18
3	Distribución de la mortalidad por cáncer gástrico y la seroprevalencia de <i>H. pylori</i> en México	22
4	Metabolismo primario y relación con el metabolismo secundario de plantas	37
5	Origen de metabolitos secundarios a partir de metabolitos primarios	38
6	Estructura química del limoneno y mentol	40
7	Estructura química de los monoterpenos pineno y piretrina	40
8	Estructura química del ácido giberélico y del fitol	41
9	Molécula de escualeno y sus derivados triterpenos cíclicos estigmasterol y sitosterol	42
10	Estructura química del colesterol	42
11	Estructuras químicas de la Ecdisona a) y de la Azadiractina b)	43
12	Estructura química del β – caroteno	43
13	Caucho y gutapercha	44
14	Estructura química del fenol	44
15	Estructura química de las saponinas	50
16	Clasificación de las saponinas de acuerdo al tipo de de genina presente: A) esteroidal [A.1 espirostánica, A.2 furostánica], B) triterpénica y C) alcaloide-esteroidal	50

17	Ejemplos de saponinas mono y bidesmosídicas	51
18	Estructura de la digitoxina de <i>Digitalis purpurea</i>	54
19	Total de nuevos fármacos 1982 – 2008	57
20	Metabolización de MTT a sales de Formazán por células viables	65
21	Distribución de la familia <i>Agavaceae</i>	70
22	<i>Agave lechuguilla</i>	73
23	<i>Agave lophantha</i>	74
24	<i>Agave victoria reginae</i>	75
25	Formación de espuma del crudo de saponinas de <i>A. lechuguilla</i>	96
26	Hemólisis producida por el crudo de saponinas de <i>A. lechuguilla</i>	97
27	Anillo color azul-verdoso producido por los glucósidos presentes en las saponinas de <i>A. lechuguilla</i>	97
28	Bandas observadas en CCF del crudo de saponinas de <i>A. lechuguilla</i> a la misma distancia de los controles de saponinas	98
29	Cromatografía en columna del extracto insoluble en hexano de <i>A. lophantha</i>	100
30	Cromatografía en Capa Fina de gel de sílice de las fracciones del extracto insoluble en hexano de <i>A. lophantha</i>	100
31	Viabilidad de células PBMC a diferentes concentraciones de saponina de <i>A. lechuguilla</i> con Azul de Tripano	103
32	Viabilidad de células PBMC a diferentes concentraciones de saponina de <i>A. lechuguilla</i> con MTT	103
33	Espectro Infrarrojo de la saponina glicosilada de <i>A. lechuguilla</i>	104

34	Espectro de Masas de la saponina glicosilada de <i>A. lechuguilla</i>	105
35	Espectro de masas de la aglicona	106
36	Estructura de la saponina glicosilada de <i>A. lechuguilla</i> propuesta	106

NOMENCLATURA

DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNAr	Ácido ribonucleico ribosomal
ATP	Adenosín Trifosfato
α	Alfa
PBS	Buffer fosfato salino (Phosphate buffered saline)
cm	Centímetros
C	Citosina
CoA	Coenzima A
N	Concentración Normal
CCF	Cromatografía en Capa Fina
d	Días
DMSO	Dimetil sulfóxido
LD ₅₀	Dosis letal media
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima
CagA	Gen asociado a citotoxicidad
VacA	Gen asociado a vacuolización
g	Gramos
°C	Grado centígrado
G	Guanina
h	Horas
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IR	Infrarrojo
IBP	Inhibidor de la bomba de protones
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL-8	Interleucina-8
ISSSTE	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado
Kcal/mol	Kilocalorías por mol
KDa	Kilodaltons
kJ/mol	Kilo Joulies por mol
LPS	Lipopolisacáridos
UV	Luz Ultra violeta
MHz	Megahertz
μ m	Micras o micrómetros
μ g	Microgramos
μ L	Microlitros
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
min	Minutos
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud

GRO α	Oncogen relacionado con crecimiento alfa
pH	Potencial de hidrógeno
%	Por ciento
rpm	Revoluciones por minuto
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
MTT	Sal de tetrazolio
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosa
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
UBT	Prueba de aliento de la urea (Urea breath test)
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México

RESUMEN

La bacteria *Helicobacter pylori* es reconocida como la principal causa de gastritis crónica, úlceras gástricas y duodenales y algunos tipos de cáncer gástrico. En los últimos años se han tratado estas patologías no solo con agentes antiácidos y gastroprotectores, sino que además se han incorporado antibióticos para erradicar a la bacteria. Sin embargo, en algunos casos, estas terapias no son exitosas debido a que desarrolla resistencia a los antibióticos existentes, situación que ha llevado a la búsqueda de nuevos compuestos que garanticen su control, además de que reduzcan los efectos secundarios. En este trabajo se investigó la actividad antibacteriana sobre *H. pylori* de 3 plantas de la familia *Agavaceae*. Las especies seleccionadas fueron *Agave lechuguilla*, *A. lophantha* y *A. victoria reginae*, ya que además de que poseen diversas características útiles para el hombre, son consideradas efectivas en medicina tradicional para tratar otros padecimientos infecciosos de origen bacteriano por poseer metabolitos que pueden actuar como agentes bactericidas. Se obtuvieron extractos metanólicos para cada una de las especies y se detectó la presencia de insaturaciones, saponinas, carbohidratos y alcaloides mediante el estudio fitoquímico. Se evaluó la actividad de los extractos de *A. lechuguilla* y *A. lophantha* mediante el método de dilución en agar y se observó que mostraron actividad frente a *H. pylori* a las concentraciones de 10 y 5 mg/mL y 10 mg/mL respectivamente. El extracto de *A. victoria reginae* no mostró actividad a ninguna de las concentraciones probadas. En base a estos resultados se realizó la extracción de saponinas y se realizaron pruebas que confirmaron la presencia de estos compuestos. Se evaluó la actividad antibacteriana de las saponinas de *A. lechuguilla* y *A. lophantha* obtenidas y se demostró que ambas presentan actividad a las concentraciones de 5, 1, 0.5 y 0.25 mg/mL. Se realizaron estudios citotóxicos de las saponinas de *A. lechuguilla* en células PBMC (células mononucleares de sangre periférica, “*Peripheral Blood Mononuclear cells*”) utilizando los métodos de azul de tripano y MTT en concentraciones de 0.065 a 265 mg/mL. Los resultados demostraron el 98 % de viabilidad de las células sanguíneas mononucleares, por lo que se considera que no son tóxicas para las células. Se procedió a llevar a cabo la identificación de la estructura de la saponina mediante métodos espectroscópicos de IR y de Masas, con la información obtenida podemos deducir que el compuesto aislado de *A. lechuguilla* es una saponina esterooidal con una aglicona $C_{27}H_{44}O_3$ (m/z 416), que tiene unido un oligosacárido formado por 4 hexosas y una pentosa a la cual se le atribuye la actividad antibacteriana. Con los resultados obtenidos podemos considerar que este trabajo de investigación será de mucha utilidad ya que podemos contribuir en la solución de infecciones y complicaciones por el patógeno *Helicobacter pylori*.

ABSTRACT

The bacterium *Helicobacter pylori* is recognized as the main cause of chronic gastritis, gastric and duodenal ulcers and some types of gastric cancer. In recent years, these pathologies have been treated not only with antacid agents and effect, they have been also incorporated antibiotics to eradicate the bacteria. However, in some cases, these therapies are not successful since it develops resistance to existing antibiotics, situation that has led to the search for new compounds that guarantee their control, in addition to reduce side effects. This work investigated the antibacterial activity of *H. pylori* in 3 plants of the family *Agavaceae*. The selected species were *Agave lechuguilla*, *A. lophantha* and *A. victoria reginae*, since in addition to possess different characteristics useful to man, are considered effective in traditional medicine to treat other infectious diseases of bacterial origin by its metabolites that can act as antibacterial agents. Obtained extracts methanol to each of the species and detected the presence of saponins, carbohydrates and alkaloids by means of the phytochemical study. Assessed the activity of the extracts of *A. lechuguilla* and *A. lophantha* using the agar dilution method and it was observed that they showed activity against *H. pylori* at concentrations of 10 and 5 mg/mL and 10 mg/mL respectively. The extract of *A. victoria reginae* showed no activity at any of the concentrations tested. On the basis of these results was the extraction of saponins and tests that confirmed the presence of these compounds were carried out. Evaluated the antibacterial activity of saponins from *A. lechuguilla* and *A. lophantha* obtained and showed that both present activity at concentrations of 5, 1, 0.5, and 0.25 mg/mL. Cytotoxic studies were carried out in saponins of *A. lechuguilla* into cells PBMC (mononuclear cells of peripheral blood, "*Peripheral Blood Mononuclear cells*") using blue trypan and MTT methods concentrations of 0.065 to 265 mg/mL. Results showed 98 feasibility of mononuclear blood cells, so it is considered that they are not toxic to the cells. Proceeded to carry out the identification of the structure of saponin by spectroscopic methods IR and mass, with the information obtained, we can deduce that compound isolated from *A. lechuguilla* is a saponin steroid with a $C_{27}H_{44}O_3$ (m/z 416) aglycone, which has attached an oligosaccharide formed by 4 hexose and a pentose is attributed to which the antibacterial activity. With the obtained results we can consider that this research work will be very useful because we can contribute to the solution of infections and complications by the pathogen *Helicobacter pylori*.

1. INTRODUCCIÓN

Desde tiempo inmemorial el hombre ha recurrido a las plantas en busca de curación para sus males y alivio a sus dolores. Esa búsqueda lo ha hecho profundizar en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y ampliar su experiencia en el empleo de los productos que de ellas extraen (Palacios, *et al.*, 2011).

En ésta época en la que el consumo individual de medicamentos ha aumentado tanto, surge la tendencia a volver a las fuentes naturales para curar las enfermedades, entre ellas las gastrointestinales.

La década de los años 80, marcó el inicio de una nueva era en la patogenia de dichas enfermedades. El azar permitió descubrir una nueva bacteria, llamada desde entonces *Helicobacter pylori* y su relación con las enfermedades gastroduodenales (Warren y Marshal 1984).

Tras un período de considerable escepticismo, el *Helicobacter pylori* es considerado en la actualidad como el agente principal en la patogenia de las úlceras gastroduodenales, la gastritis crónica activa tipo B, el adenocarcinoma gástrico y el linfoma tipo MALT, estimándose que la prevalencia mundial está por arriba del 50 % y, en el caso de México, la seroprevalencia es del 66% (Palacios, *et al.*, 2011).

En 1994 la Conferencia Consenso de los Institutos Nacionales de Salud, declaró a *H. pylori* como la principal causa de la úlcera péptica (IARC, 1994) y en ese mismo año, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, de la

Organización Mundial de la Salud (OMS) la clasificó como un definitivo carcinógeno clase I (International Agency for Research on Cáncer, 1994).

La infección por *H. pylori* debe ser tratada con antibióticos como cualquier otra infección bacteriana.

El tratamiento para la erradicación de *H. pylori* consta de varios esquemas que van desde monoterapia hasta la combinación de una variedad de medicamentos, desde bloqueadores de la acidez, como inhibidores de la bomba de protones (omeprazol, lansoprazol, pantoprazol y rabeprazol) y antibióticos como amoxicilina, claritromicina o metronidazol) (Romo, *et al.* 2010).

La resistencia de los microorganismos a los antibióticos comerciales es uno de los retos más grandes que enfrentan los sistemas de salud pública del mundo y *H. pylori* no es la excepción, debido a que las vías terapéuticas de erradicación del *H. pylori* existentes se convierten cada vez en menos confiables dados los altos costos de éstos medicamentos, los efectos secundarios provocados a los pacientes, el incumplimiento con la terapia indicada y la presencia de cepas resistentes a los antibióticos usados comúnmente en el tratamiento (Palacios, *et al.*, 2011).

En vista de la incompleta erradicación lograda por la terapia tradicional, es necesaria la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento de la infección por *H. pylori*.

Los productos naturales, específicamente los de origen vegetal, constituyen potenciales fuentes para el descubrimiento y desarrollo de nuevos agentes efectivos contra las infecciones que hoy en día resultan difíciles de tratar (Palacios, *et al.*, 2011).

2. HIPÓTESIS

Los compuestos presentes en las especies *Agave lechuguilla*, *A. lophanta* y *A. victoria reginae* tienen actividad inhibitoria sobre *Helicobacter pylori*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto antimicrobiano de los extractos de 3 plantas de la familia Agavaceae sobre *Helicobacter pylori* e identificar los compuestos activos.

3.2 Objetivos particulares

1. Obtener los extractos metanólicos de los agaves en estudio e identificar parcialmente sus metabolitos.
2. Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos de los agaves sobre *H. pylori*.
3. Separar e identificar compuestos de los extractos activos por métodos cromatográficos.
4. Evaluar la actividad contra *H. pylori* de los compuestos obtenidos.
5. Evaluar la citotoxicidad de los compuestos activos.
6. Identificar por métodos espectroscópicos los compuestos activos.

4. ANTECEDENTES

4.1 Aspectos históricos y descubrimiento de *Helicobacter pylori*

A pesar de que *H. pylori* acompaña al ser humano desde tiempos inmemoriales, los científicos tardaron más de un siglo en identificarla. En 1875, en un trabajo realizado en el Royal Perth Hospital de Australia, anatomistas alemanes lograron visualizar bacterias helicoidales en la superficie de la mucosa gástrica en el 98% de las gastritis crónicas y en el 80% de los pacientes con úlcera gástrica, utilizando la tinción de plata de Warthin-Starry, sin embargo, el descubrimiento fue ignorado al no conseguir que los microorganismos crecieran en un cultivo puro (Blaser, 2005).

Pero la visualización de las bacterias espirales en el estómago no era algo nuevo. Las primeras descripciones se remontan a finales del siglo XIX, habiendo sido descritas en el jugo gástrico de perros y gatos en 1893 por Bizzozero seguido de Salomon en 1896 (González-Morales, y col., 2004).

Resulta curioso que, a pesar de que en 1906 Krienitz encontrara estos organismos en el jugo gástrico de pacientes con cáncer de estómago, sea difícil encontrar referencias bibliográficas hasta 1938, cuando Doenges realizó el primer estudio sistemático en busca de las bacterias helicoidales en necropsias de estómagos humanos y encontró organismos espirales en el 43% de los humanos estudiados. Por primera vez en 1975, la gastritis se asoció con la presencia de una bacteria Gram negativa en la mucosa

gástrica misma que Warren observó en 1979, en biopsias gástricas, en forma de espiral y localizadas debajo de la capa mucosa (González-Morales, y col., 2004).

Fue hasta 1982 que los doctores Australianos J. Robin Warren y Barry J. Marshall aislaron por primera vez de la mucosa gástrica humana a *H. pylori*. En 1983, Marshall y Skirrow acuerdan el nombre de *Campylobacter pyloridis* ya que el porcentaje de G más C en su DNA fue de 34% que correspondía al rango normal de *Campylobacter* (Dunn, *et al.*, 1997; Konturek, *et al.*, 2006).

Para demostrar la patogenicidad de esta bacteria Marshall decidió ingerir una muestra de cultivo obtenido de un hombre de 66 años de edad con diagnóstico de dispepsia no ulcerosa, 14 días después resultó con la misma enfermedad. Al cabo de 10 días se demostró histológicamente que se trataba de una gastritis. En 1987 se le denominó *Campylobacter pylori* para adaptarse a la nomenclatura de la época. Finalmente en 1989, Goodwin, gracias a sus trabajos, lo incluye en el género *Helicobacter* con base en la secuencia de bases de la molécula 16S del RNAr. Desde entonces se le denominó *Helicobacter pylori* y se han aislado distintas especies de origen gástrico y no gástrico, del hombre y animales (González-Morales, y col., 2004).

En 1994, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, una institución de la OMS, revisó la evidencia disponible y clasificó a *H. pylori* como carcinógeno humano tipo I y en el año 2005, el premio Nobel de Fisiología y Medicina fue otorgado a Barry Marshall y Robin Warren por su descubrimiento de *H. pylori* y estudios acerca de su fisiología y ecología (Konturek, *et al.*, 2006).

4.2 Microbiología

4.2.1 Características morfológicas

H. pylori es un bacilo Gram negativo, existe en diversas formas: bacilo, espiral corta, hélice, aunque también se puede encontrar en forma de coco. Esta última forma es inducida por estrés ambiental en condiciones de cultivo desfavorables, como pH alcalino, temperatura elevada, aumento en la tensión de oxígeno, cultivo prolongado o en presencia de antibióticos. *H. pylori* mide aproximadamente 2.5 - 5.0 μm de largo y 0.5 - 1.0 μm de diámetro. Posee de 4 a 6 flagelos unipolares de 3 μm de longitud aproximadamente que le dan una gran movilidad, lo que le permite penetrar rápidamente en soluciones viscosas como la capa del moco que cubre las células epiteliales gástricas facilitando así la colonización en el estómago (Goodwin and Armstrong, 1990; Lambert, *et al.*, 1995; O'Rourke and Bode, 2001).

H. pylori es un microorganismo capaz de crecer en distintos medios de cultivo si bien requiere diferentes factores de crecimiento. Los medios de cultivo semisólidos más frecuentes son Agar Mueller-Hinton y Agar Columbia y los suplementos más comúnmente empleados son la sangre o derivados de ella. En cultivos, a partir de biopsias, sembrados en agar sangre a 37°C y bajo condiciones microaerofílicas (5% O₂, 10% CO₂), las colonias de *H. pylori* tardan en aparecer entre 3 y 5 días. Tiene un crecimiento óptimo a pH cercano a 7.0, las colonias son circulares pequeñas, brillantes, con una apariencia convexa y translúcida, y con un diámetro de 1-2 mm. Después de un cultivo prolongado, las formas cocoides son predominantes y se denominan formas viables no cultivables. En microscopio electrónico, las formas cocoides se observan en forma de U. Estas estructuras son metabólicamente activas; sin embargo, no pueden ser cultivadas *in vitro*. (Dunn, *et al.*, 1997; González-

Morales y col., 2004). Es difícil de cultivar en medio líquido aunque se logra con menor dificultad a partir de caldo de *Brucella*, infusión cerebro-corazón, Mueller-Hinton y tripticasa soja, todos ellos suplementados con nutrientes (Mégraud, 1995).

4.3 Enfermedades asociadas a *Helicobacter pylori*

4.3.1 Infección por *H. pylori*

H. pylori está etiológicamente asociado a enfermedades gastroduodenales (Innocenti, *et al.*, 2001).

La adquisición natural de la infección por *H. pylori* comienza, la mayoría de las veces, en la niñez. Una vez que la bacteria se establece en la mucosa gástrica persiste por años. No obstante existen estudios, realizados en niños, que sugieren que en los primeros años de vida, previos al establecimiento de la infección, puede ser común una infección transitoria (Mitchell, 2001). La historia natural de la infección por *H. pylori* presenta diferentes escenarios clínicos: infección aguda, gastritis crónica, gastritis crónica atrófica, úlcera duodenal y la transformación del epitelio a metaplasia intestinal, displasia epitelial gástrica y finalmente cáncer gástrico.

4.3.2 Infección aguda

Al inicio de la fase aguda de la infección es subclínica en la mayoría de las personas. Después de ser ingerido, *H. pylori* penetra a través de la capa mucosa viscosa y se multiplica en proximidad cercana a las células epiteliales superficiales (Dixon, 2001). *H. pylori* coloniza primero el antro, debido a que no existen células parietales que secreten ácido (Gur, *et al.*, 1999; Innocenti, *et al.*, 2001; Lee, *et al.*, 1995). En esta fase inicial existe una intensa proliferación bacteriana e inflamación gástrica que

es disparada por componentes de la membrana externa de la bacteria como los lipopolisacáridos (LPS) que inducen la producción de IL-8 y GRO α los cuales promueven el influjo continuo de neutrófilos en la mucosa gástrica infectada (Innocenti, *et al.*, 2001). Algunas personas presentan un período transitorio con síntomas gastrointestinales inespecíficos; durante este período se desarrolla hipoclorhidria, la cual puede durar meses o años (Graham, *et al.*, 2004).

4.3.3 Gastritis crónica superficial

Después de un período de algunas semanas, se establece una segunda fase crónica superficial, sin alteraciones macroscópicas características, en la que se reduce la respuesta inflamatoria a niveles bajos, pasando a un estado asintomático estable (Gilger, 2000), donde el huésped desarrolla una respuesta inmune que generalmente no es efectiva en la eliminación de *H. pylori*. La infección crónica afecta la liberación de gastrina y en consecuencia, la secreción de ácido clorhídrico (Gur, *et al.*, 1999). El mecanismo que conduce a una exagerada secreción de gastrina en la infección crónica por *H. pylori* no es muy claro; una posibilidad es que la generación de amonio por la ureasa de *H. pylori* crea un ambiente alcalino en la vecindad de las células G, que pueden estimular la liberación de gastrina (McColl, 1992). Aproximadamente el 90% de las personas con gastritis están infectadas con *H. pylori* (Nagorni, 2000).

4.3.4 Gastritis crónica atrófica

Aproximadamente el 40% de las gastritis crónicas superficiales se convierten en atróficas con el paso del tiempo. Las personas infectadas que no han presentado síntomas asociados se vuelven asintomáticas y en la mayoría de los casos, la

consecuencia final es una inflamación crónica asintomática (Correa, 1992; Correa and V. W. Chen, 1994). La gastritis crónica atrófica asociada con la infección por *H. pylori* comúnmente es un proceso multifocal que involucra el antro y el cuerpo gástricos. Esta es una lesión premaligna, en donde la mucosa sufre alteraciones progresivas ligadas a un estado inflamatorio crónico, hay adelgazamiento de la mucosa (Correa, 1992; Correa, and V. W. Chen, 1994) y pérdida de células glandulares gástricas (Correa, 1992; Correa, and V. W. Chen, 1994; Dixon, 2001), después de la pérdida de las glándulas puede presentarse erosión o ulceración de la mucosa (Dixon, 2001). Este es el último paso del proceso crónico (Correa, 1992; Correa, and V. W. Chen, 1994), que se encuentra presente en el 90% de los cánceres gástricos (Kato, *et al.*, 1992).

4.3.5 Úlcera péptica

De origen multifactorial, la lesión consiste en el daño de la capa mucosa que protege al estómago de la acción del ácido y de las enzimas. La úlcera péptica se localiza principalmente en la curvatura menor del estómago y a nivel de la primera porción del duodeno. La infección por *H. pylori* es la causa más común de la úlcera gástrica y úlcera duodenal. El riesgo de desarrollar úlceras es del 10-15% (Logan, and M. M. Walker, 2001), normalmente la bacteria no coloniza el duodeno, pero en los pacientes con hiperclorhidria, el ácido llega al duodeno y las células intestinales son reemplazadas por células gástricas que permiten la colonización por *H. pylori* (Cover and M. J. Blaser, 1996; Go, 1997). Los pacientes con infección por *H. pylori* que desarrollan úlcera duodenal presentan cambios en la función gástrica: una elevada liberación de gastrina de la mucosa antral y un incremento en la secreción de ácido estimulado por la gastrina (El Omar, *et al.*, 1995). La prevalencia de la infección por

H. pylori en pacientes con úlcera duodenal es mayor al 90% (Cover, L. and M. J. Blaser, 1996; Go, 1997) y entre el 70-80% en la úlcera gástrica (Walsh and W. L. Peterson, 1995). Menos del 1% de los pacientes con úlcera duodenal llegan a desarrollar cáncer gástrico, dado que la ruta que lleva al desarrollo de dichos padecimientos son excluyentes (Farthing, 1998; Parsonnet, 1998, Walsh and W. L. Peterson. 1995).

4.3.6 Metaplasia intestinal

Se ha encontrado que la infección por *H. pylori* juega un papel en el desarrollo de metaplasia intestinal (Topal, *et al.*, 2004). Comienza en la unión del cuerpo y el antro y se extiende al antro y el fondo. La metaplasia intestinal se considera como un factor de riesgo para la progresión a cáncer gástrico (Dixon, 2001), se asocia con la gastritis crónica atrófica que precede el desarrollo de adenocarcinoma de tipo intestinal, dentro del proceso de carcinogénesis gástrica (Correa, 1982; Correa, *et al.*, 1990; Walsh, and W. L. Peterson. 1995). Las glándulas gástricas son reemplazadas por epitelio de tipo intestinal diferenciado, similar al del intestino delgado normal, fácilmente reconocido por la presencia de células caliciformes (Antonioli, 1990). Se han descrito dos tipos: metaplasia intestinal completa y metaplasia intestinal incompleta, en esta última la diferenciación en epitelio intestinal no es total. Desde el punto de vista bioquímico se producen enzimas similares a las del intestino delgado como fosfatasa alcalina, disacaridasas, aminopeptidasa, etc. (Rothery, G. A. and D. W. Day, 1985).

4.3.7 Displasia epitelial gástrica

La displasia epitelial gástrica es una lesión precancerosa, generalmente ocurre en el contexto de una gastritis crónica atrófica y suele acompañarse de metaplasia intestinal. Con frecuencia se encuentran áreas de displasia alrededor de los adenocarcinomas gástricos (Rugge, *et al.*, 1995), siendo la única lesión histopatológica que se asocia específicamente con el cáncer gástrico. Los cambios displásicos se definen por la presencia de atipias celulares (modificaciones nucleares con pleomorfismo, hiperchromatismo, aumento de la relación núcleo/citoplasma, pérdida de polaridad), anomalías de diferenciación (disminución parcial o total de la secreción mucosa y aumento del número de células indiferenciadas) y desorganización de la morfología de criptas y glándulas (Rugge, *et al.*, 1995). Por lo general, se clasifica en ligera, moderada y severa. Mientras que en la mayoría de los casos, la displasia leve tiende a regresar o permanecer estable, tanto la displasia moderada y fundamentalmente la grave están frecuentemente asociadas con el desarrollo de adenocarcinoma gástrico (Rugge, *et al.*, 1995). Aproximadamente en un 10% de los pacientes la displasia epitelial puede progresar a cáncer gástrico en el curso de 5 a 15 años, sin embargo, en la mayoría de los pacientes esta displasia regresa o permanece estable (Rugge, *et al.*, 1994).

4.3.8 Cáncer gástrico

Estudios en diferentes poblaciones y en modelos animales, muestran que *H. pylori* está asociado con el desarrollo de cáncer gástrico (Asaka, *et al.*, 1997). En la historia natural de la carcinogénesis gástrica se establece la siguiente evolución: Gastritis crónica superficial => Gastritis crónica atrófica (GCA) => Metaplasia intestinal (MI)

=> Displasia (leve - moderada - severa) => Cáncer gástrico (CG). *H. pylori* desencadenaría una cascada de eventos que desembocan finalmente en el CG, por lo que existe una mayor probabilidad de desarrollo de cáncer gástrico entre más temprana sea la etapa en que se adquiere la infección (Correa, 1996).

La prevalencia de la infección entre los pacientes con cáncer gástrico es ligeramente mayor en países en vías de desarrollo (60%) en comparación con la observada en países desarrollados que es del 53% (Dixon, 2001). Aproximadamente, el 1% de los pacientes infectados con *H. pylori* desarrollarán cáncer gástrico (Farthing, 1998; Imrie, *et al.*, 2011), y se detecta con mayor frecuencia en pacientes con cáncer gástrico en etapas tempranas, que en aquellos con etapas avanzadas de la enfermedad, debido posiblemente a que la bacteria no coloniza epitelios atrofiados (Huang, *et al.*, 1998).

En la Figura 1 se resume la secuencia del proceso de carcinogénesis cuyos estadios constituyen las lesiones precursoras del cáncer gástrico (Correa, 1996).

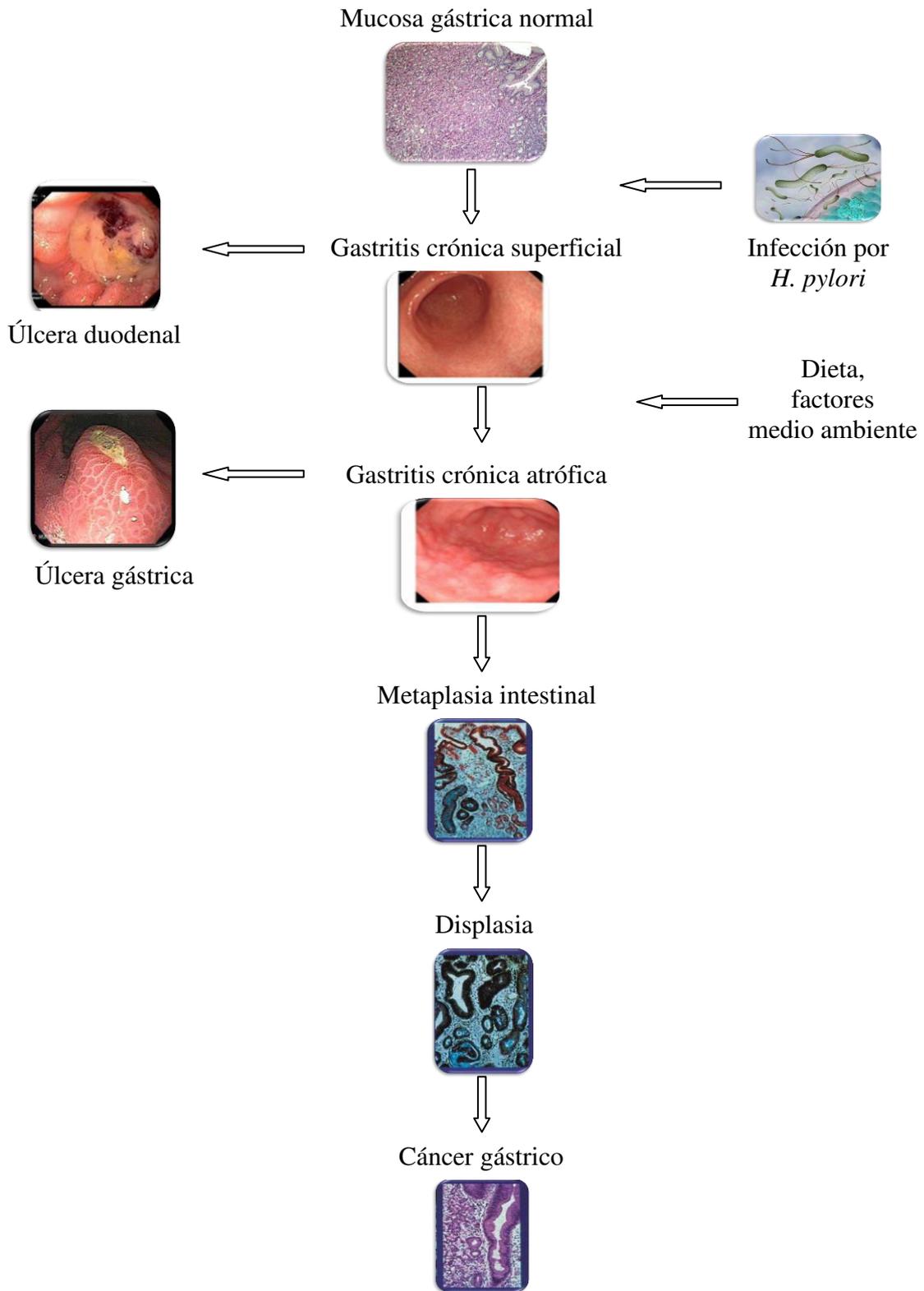


Figura 1. Evolución natural para la infección por *H. pylori* (Correa, 1996).

4.4 Patogénesis

H. pylori se ha especializado para vivir y persistir en un ambiente hostil como lo es el estómago humano, para lograr esto posee una serie de factores y mecanismos que le han permitido adaptarse exitosamente a él (Ogura, *et al.*, 2000).

4.4.1 Componentes de patogenicidad

a) Estructura espiral: le permite a la bacteria introducirse a través de la capa de moco gástrico actuando de forma similar a un sacacorchos y favoreciendo el acercamiento a las células epiteliales gástricas (Dunn, *et al.*, 1997, González-Morales y col., 2004).

b) Motilidad: Los flagelos le confieren gran movilidad y le permiten introducirse con rapidez en la capa de moco del estómago y no ser eliminado por los mecanismos defensivos del huésped (González-Morales y col., 2004, McGee, *et al.*, 2000).

c) Adherencia: Posee una gran variedad de adhesinas que reconocen en forma específica a los receptores de la mucosa gástrica y se unen a ellos comenzando la colonización bacteriana (Dunn, *et al.*, 1997; González-Morales y col., 2004).

d) Ureasa: proteína potente que transforma la urea en amonio, el cual produce un microambiente alcalino alrededor de la bacteria que le confiere protección ante la acidez gástrica. La ureasa también tiene propiedades citotóxicas; junto con el amonio dañan la mucosa y proporcionan nutrientes necesarios para la adhesión de la bacteria al epitelio gástrico. Además, el amonio puede ser un precursor de la síntesis proteica de algunas adhesinas de la bacteria (González-Morales, y col., 2004, Hofman, *et al.*, 2004, Panchal, *et al.*, 2003).

e) Otras enzimas: La lipasa y proteasa propician la desintegración del moco gástrico y la pérdida de hidrofobicidad de la mucosa y posiblemente disminuyen la capacidad de las células mucosas para secretar moco; la catalasa y superóxido dismutasa protegen a la bacteria de los metabolitos tóxicos producto de procesos oxidativos de defensa de los macrófagos y neutrófilos; además, produce otras enzimas como la fosfolipasa A2, fosfolipasa C, mucinasa, fosfatasa alcalina y ácida, entre otras (Dunn, *et al.*, 1997, González-Morales y col., 2004).

4.4.2 Componentes de virulencia

a) Citotoxina vacuolizante VacA: Tiene un efecto citopático, produce la formación de vacuolas en las células eucariotas. La totalidad de las cepas de *H. pylori* contiene el gen *vacA*, pero sólo el 50% secretan la toxina activa. Se han descrito variantes alélicas de *vacA* principalmente en la región del péptido señal (s1 y s2) y en la porción central de la proteína (m1 y m2). Las cepas que contienen los alelos s1/m1 (Tipo I), asociado a la presencia de *cagA*, se consideran de alto potencial citotóxico (Ayala, *et al.*, 2004; Blaser, 2005; Gomes and De Martinis, 2004; Hofman *et al.*, 2004; McGee and Mobley, 2000; Panchal, *et al.*, 2003).

b) Proteína CagA: Es codificada por el gen *cagA* (gen asociado a citotoxina), el cual puede estar presente (*cagA*⁺) o no presente (*cagA*⁻). Esta proteína podría estar implicada en el proceso de activación de la toxina vacuolizante y podría influir en la respuesta inflamatoria y aumentar la secreción de Interleucina 8 (IL-8) por las células epiteliales, lo que conduce a un estado de inflamación de la mucosa gástrica. Las cepas *cagA*⁺ y *vacA*⁺ se relacionan con alto riesgo de causar úlcera duodenal, gastritis

atrófica y cáncer gástrico (Blaser, 2005; González-Morales, y col., 2004; Hofman, *et al.*, 2004; McGee and Mobley, 2000; Panchal *et al.*, 2003).

c) Evasión de la respuesta inmune: La bacteria tiene la habilidad de inducir muerte celular de los linfocitos T. La adherencia de *H. pylori* promueve el desarrollo de autoanticuerpos contra las células parietales, resultando en una gastritis crónica y pérdida de células parietales, así pues el mecanismo involucrado en la producción de autoanticuerpos podría ser un mimetismo molecular entre los lipopolisacáridos expresados constitutivamente en la bacteria y epítopes asociados en las células parietales lo que permite la persistencia de esta bacteria en el epitelio (Hofman, *et al.*, 2004; McGee and Mobley, 2000; Panchal, *et al.*, 2003).

d) Alteraciones de 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 elevadas concentraciones basales de gastrina 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 (Blaser, 2005; González-Morales, y col., 2004).

4.5 Prevalencia mundial de la infección

La prevalencia de la infección por *H. pylori* sigue variando mucho entre los países en desarrollo y los países desarrollados según el origen étnico, lugar de nacimiento y los factores socioeconómicos entre las personas que viven en el mismo país. La propagación intrafamiliar parece desempeñar un papel central en la transmisión de la

infección, tanto en los países en desarrollo y desarrollados. La infección varía según la región geográfica, pero en general los países industrializados son los que tienen una menor prevalencia, de tal manera que regiones como América del Norte, el Oeste de Europa y Australia tienen una prevalencia menor a 55%. En los países en vías de desarrollo como China y México la incidencia es de 55 a 64%. Para la parte baja de América del Sur, el norte de África, el resto de Asia, España y Portugal es de 65 a 74% y para la parte superior de América del Sur, el norte y este de Europa y el sur de África es mayor a 75% (Perez-Perez, 2004; Konturek *et al.*, 2006) (Ver Figura 2).

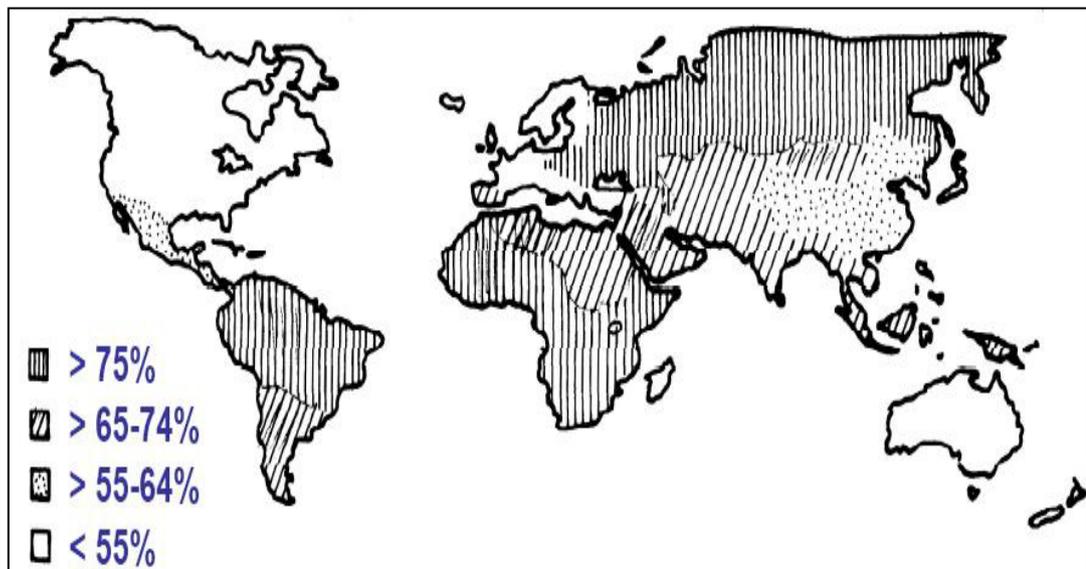


Figura 2. Variación geográfica de la prevalencia de *H. pylori* alrededor del mundo (Konturek, *et al.*, 2006).

Thomas *et al.*, 1992, aislaron *H. pylori* de heces humanas de una persona infectada en Gambia, lo cultivaron en medios selectivos después de la concentración de bacterias fecales por centrifugación con una mezcla de gases microaerófila, logrando observar colonias con las mismas características de crecimiento, apariencia microscópica y actividad enzimática, que las de un aislado gástrico de *H. pylori*. Además, de que preparaciones de proteínas y los perfiles electroforéticos fueron

antigénicamente similares (bandas de proteínas principales de 62 y 26 KDa, correspondientes a las subunidades de la enzima ureasa). En 9 niños de 23 seleccionados al azar de entre 3-27 meses, usando la misma técnica se aisló esta bacteria, concluyendo que la transmisión fecal-oral es probablemente importante en la propagación de la infección en esas comunidades.

Ortiz, y col., 2003 evaluaron la prevalencia de *H. pylori* en niños y adultos de comunidades indígenas del estado Delta Amacuro, Venezuela, que son diferentes en cuanto a condiciones higiénicas y de alojamiento. Se evaluaron 98 niños (7 ± 3.37 años) y sus madres (33.96 ± 13.77 años) de dos comunidades indígenas de la etnia warao del estado Delta Amacuro, Venezuela. Se determinaron anticuerpos séricos IgG anti-*H. pylori* e IgA secretora total y específicos, además de antígenos de *H. pylori* en heces. Se encontró un 38% de seroprevalencia en la población infantil y un 84% en las madres. En los niños de la comunidad que tiene condiciones sanitarias y ambientales más deficientes, los títulos de anticuerpos IgG específicos y los niveles de IgA secretora total fueron significativamente ($p < 0.0001$) más bajos, y se encontró un porcentaje alto de niños que presentaron antígenos de *H. pylori* en heces ($p < 0.0001$). Los niveles de IgA secretora específica fueron positivos y similares en ambos grupos. Además, los estudios de calidad de agua reflejaron mayor cantidad de bacterias coliformes y sólidos totales en la población de Isla Misteriosa que en Playa Sucia. Los resultados indican que en estas poblaciones existe una alta prevalencia de infección por *H. pylori* y que las condiciones ambientales pueden incrementar el riesgo de infección y el daño en la mucosa gastrointestinal.

Páez, y col., 2006 determinaron la prevalencia de la infección con *H. pylori* y el patrón de infección según edad, sexo, estado nutricional y condiciones

socioeconómicas, en 170 niños entre 3 y 14 años de edad, de ambos géneros. Se determinó infección por la bacteria (test de aliento con urea ^{13}C), edad, estado nutricional y talla-edad, hemoglobina (cianometahemoglobina), ferritina sérica (ELISA), estrato socioeconómico, condición de vivienda, número de personas y familias que viven en el hogar y calidad de los servicios. El 78,8% de los niños estaban infectados y no se encontró correlación significativa con el género pero sí con la edad; el 25,9% presentaron déficit nutricional y el 46,5% talla baja. El 98,1% de las familias se encontraban en situación de pobreza y el 98% de las viviendas presentaban deficiencias sanitarias; en promedio vivían $6,0 \pm 2,4$ personas en el hogar y 3,2 personas compartían un mismo dormitorio. Se encontró que la probabilidad de infección era mayor en aquellos niños que presentaban déficit de talla y que el estrato socioeconómico, el nivel de instrucción materno, las precarias condiciones de alojamiento y el hacinamiento se asociaban significativamente a la infección. El nivel socioeconómico en la niñez está asociado con una alta colonización por el microorganismo, la edad, el hacinamiento y un bajo nivel de instrucción de la madre pueden aumentar el riesgo a esta infección.

Martínez, y col., 2008 estudiaron la presencia de esta bacteria en muestras de biopsia obtenidas mediante endoscopia de 69 pacientes con úlcera duodenal, úlcera gástrica, gastritis crónica y dispepsia. Los diagnósticos de úlcera gástrica y gastritis crónica fueron confirmados histológicamente. Se analizaron 27 úlceras duodenales, 12 úlceras gástricas, 24 gastritis crónicas y 6 dispepsias. Se detectó la presencia de *H. pylori* a través de la amplificación de un fragmento del gen *ureA* mediante la reacción en cadena de la polimerasa, en el 100 % de las úlceras duodenales, en el 100 % de las úlceras gástricas, en el 83 % de las dispepsias y en el 92 % de las gastritis crónicas, y se observó una prevalencia total del 95,7 %.

4.6 Prevalencia y distribución geográfica de *H. pylori* y su relación con la mortalidad por Cáncer Gástrico en México

En 1998 Torres *et al.*, 1998 citado por Torres *et al.*, 2005 realizó un estudio para detectar la infección con *H. pylori* en México donde se analizaron 11,000 muestras de suero colectadas de 1987 a 1988. Las muestras fueron representativas de todas las edades y todas las regiones del país e incluyeron todos los niveles socioeconómicos. La seroprevalencia fue de 20% en niños de hasta un año de edad, casi 50% en niños de diez años. En adolescentes, la prevalencia de la infección se incrementó considerablemente de tal forma que a la edad de 20 años, 70% de la población estaba infectada. En adultos mayores de 20 años, la seroprevalencia fue de 82.6%. Cinco años más tarde, López *et al.*, 2003 citado por Chihu *et al.*, 2005 encontró resultados similares, la seroprevalencia fue del 80%.

Se analizaron los resultados obtenidos en el estudio de Torres *et al.*, 2005 y se correlacionaron con el índice de mortalidad por cáncer gástrico en México que fue de 6.5 por cada 100, 000 habitantes reportado por el Instituto Nacional de Geografía y Estadística en 1991 (INEGI) (Fig. 3). Para el análisis, los 32 estados del país fueron divididos en cuatro grupos de acuerdo a su índice de mortalidad y la seroprevalencia fue calculada por estado, los resultados fueron los siguientes:

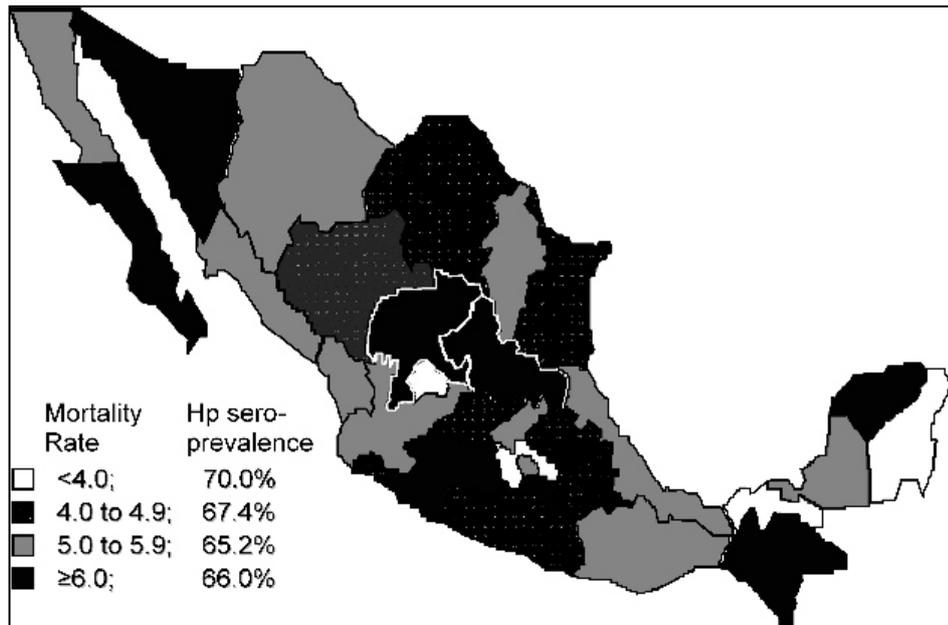


Figura 3. Distribución de la mortalidad por cáncer gástrico y la seroprevalencia de *H. pylori* en México (Torres, *et al.*, 2005).

- 1.- Grupo I: 70% seroprevalencia y <4.0 índice de mortalidad: Aguascalientes, Estado de México, Tabasco y Quintana Roo.
- 2.- Grupo II: 67.4% seroprevalencia y 4.0 a 4.9 índice de mortalidad: Coahuila, Durango, Tamaulipas, Guanajuato, Colima, Guerrero, Hidalgo y Puebla.
- 3.- Grupo III: 65.2% seroprevalencia y 5.0 a 5.9 índice de mortalidad: Nuevo León, Baja California Norte, Chihuahua, Sinaloa, Jalisco, Nayarit, Querétaro, Veracruz, Oaxaca y Campeche.
- 4.- Grupo IV: 66.0% seroprevalencia y ≥6.0 índice de mortalidad: Baja California Sur, Sonora, San Luis Potosí, Zacatecas, Michoacán, Tlaxcala, Chiapas y Yucatán (Torres, *et al.*, 2005).

En el año 2001, el INEGI reportó que el índice de mortalidad por cáncer gástrico había decrecido en los últimos diez años y pasó de 6.5 a 4.9 por cada 100,000 habitantes (Chihu, *et al.*, 2005).

Dos años más tarde, Bosques-Padilla *et al.*, 2003 examinaron 261 pacientes con sintomatología gástrica quienes fueron sometidos a endoscopia gastrointestinal en el Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González en Monterrey, Nuevo León. Entre los pacientes estudiados, 209 (80.1%) padecían dispepsia no ulcerosa, 30 (11.5%) úlcera péptica y 22 (8.4%) displasia de alto grado o cáncer gástrico. La prevalencia total de *H. pylori* fue de 67.8%.

Ese mismo año, Leal, *et al.*, 2003, determinaron la magnitud de la reinfección contra recrudescencia de la infección por *H. pylori* después del tratamiento. Se estudiaron pacientes niños y adultos con síntomas gastrointestinales superiores tratados en el Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) de la Ciudad de México. La infección fue diagnosticada con la prueba de aliento de la urea (UBT por sus siglas en inglés), histología y cultivo. Los pacientes infectados recibieron terapia triple y aquellos que resultaron UBT negativos después de 4-6 semanas del tratamiento se consideraron con la infección erradicada y fueron incluidos en el estudio. A 141 pacientes que se les erradicó la infección se les monitoreó la reincidencia con la UBT a los 3, 6, 9, 12, 18, y 24 meses. La bacteria fue aislada de biopsias gástricas antes del tratamiento y al tiempo de la reincidencia y los cultivos obtenidos se compararon por genotipificación. Durante este periodo, el 27% de los casos (32) de reincidencia fueron documentados, la mayoría ocurrió durante el primer año. En 9 de los 32 (28.1%) casos, la

reincidencia fue erradicada espontáneamente, sugiriendo que fueron reinfecciones transitorias. Los aislamientos de *H. pylori* de 12 casos de reincidencia fueron genotipificados; 9 (75%) fueron clasificados como verdaderas reinfecciones y 3 como recrudescencias.

Garza-González *et al.*, 2006 reportaron la genotipificación de los genes *vacA* y *cagA* de 50 aislamientos de *H. pylori* de pacientes de la región noreste del país. Los cultivos fueron caracterizados mediante la PCR y se investigó la correlación entre los genotipos y los diferentes diagnósticos clínicos. El genotipo más frecuente de *vacA* fue s2/m2. De los aislamientos 32 (64%) fueron *cagA* positivos. El genotipo s1/m1 fue asociado con cepas *cagA* negativas. No se encontró relación entre los genotipos de *vacA* y *cagA* y los diagnósticos clínicos (Méndez-Sánchez y Uribe, 2010).

Vallejo y colaboradores en el año 2010 realizaron un estudio transversal, retrospectivo y descriptivo de revisión de expedientes de enero a diciembre de 2007 sobre pacientes de la tercera edad infectados por *H. pylori* atendidos en el Hospital Regional de Puebla-ISSSTE. De 74 pacientes atendidos en el Servicio de Geriátrica en el tiempo estipulado, se encontraron 27 pacientes (36.48%) infectados por *H. pylori*: 17 hombres (62.96%) y 10 mujeres (37.04%). El rango de edad predominante fue de 80 a 84 años (40.74%) y las lesiones histológicas sobresalientes correspondieron a gastritis crónica en 19 pacientes (70.37%); cinco de ellos (18.52%) con úlcera duodenal; dos (7.41%), con úlcera gástrica y uno (3.7%), con carcinoma gástrico. El tipo de tratamiento predominante fue administración de amoxicilina, omeprazol y claritromicina (66.66%). El grupo de investigación concluyó que la prevalencia de infección por *H. pylori* aumenta considerablemente en la población geriátrica

proponiendo continuar las investigaciones en estos pacientes con la exclusión de factores importantes predisponentes de patología digestiva y una evaluación conjunta de las condiciones histopatológicas de la mucosa gastroduodenal a fin de determinar con mayor exactitud el papel etiológico que cumple este microorganismo.

4.7 Métodos diagnósticos para la detección de la infección por *H. pylori*

El diagnóstico de la infección puede realizarse por varios métodos. Las técnicas invasivas son cuando se detecta la bacteria en muestras obtenidas por endoscopia (cultivo bacteriológico, tinciones histológicas, técnicas moleculares) y las no invasivas, son cuando se estudia alguna propiedad de la bacteria (prueba del aliento con urea-¹³C o urea-¹⁴C, prueba de la ureasa), respuesta inmune específica del hospedero (serología); presencia de antígenos (saliva o heces) No es recomendable realizar las pruebas de detección en pacientes asintomáticos. Inicialmente, en pacientes menores de 50 años con enfermedades dispépticas no complicadas, se sugiere realizar pruebas serológicas para detectar la presencia de anticuerpos anti-*H. pylori* en suero o sangre total. En caso de que los resultados de IgG resultaran negativos y persista la sintomatología, se recomienda realizar la prueba del aliento o la prueba del antígeno fecal (Versalovic, 2003). Todos los métodos presentan ventajas e inconvenientes. A la hora de elegir uno hay que tener en cuenta el fin (epidemiológico, diagnóstico o de seguimiento), el centro sanitario dónde se realice el diagnóstico y las características del paciente (López-Brea 2004, Steven, 2005).

También debe considerarse el uso de pruebas en suero de IgA, si existen señales de alarma como sangrado gastrointestinal o pérdida de peso, es recomendable realizar una endoscopia, obteniendo una biopsia de la mucosa gástrica (Versalovic, 2003).

4.7.1 Cultivo

La detección de *H. pylori* mediante el cultivo permite confirmar la infección. Debido a la dificultad de aislar y crecer la bacteria, el uso del cultivo como método de diagnóstico de la infección se encuentra limitado a estudios de investigación y la práctica médica privada. El cultivo más habitual es el de biopsias gástricas, aunque se han cultivado con éxito el jugo gástrico y las heces (Thomas, *et al.*, 1992). Su principal ventaja es permitir el estudio de la sensibilidad a los antibióticos y la caracterización molecular de la cepa. Laboratorios muy experimentados alcanzan un promedio de aislamiento de la bacteria del 75% al 90% (Kearney, 2003). El aislamiento de la bacteria permite realizar pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos, así como su caracterización bioquímica y molecular.

4.7.2 Pruebas bioquímicas

Los procedimientos de tinción proveen de información con respecto a la morfología de la bacteria y muy poca con respecto al género o especie de una bacteria. Para identificar a una bacteria es necesario realizar pruebas bioquímicas, ya que las diferentes especies de bacterias realizarán una serie de reacciones bioquímicas diferentes y únicas (Barer, 2000). Las pruebas bioquímicas identifican los compuestos químicos biológicos importantes específicos de cada bacteria, proporcionando una especie de “huella” metabólica de cada organismo. Para realizar estos ensayos es necesario conocer algunas de estas características de las bacterias como las reacciones bioquímicas celulares (enzimáticas) y los substratos que utilizan (Pitt, 2000).

La prueba de la ureasa se basa en la actividad de esta enzima que posee *H. pylori*. La ureasa hidroliza a la urea transformándola en amonio y bicarbonato. El método consiste en introducir la bacteria en una solución de rojo fenol con urea produciéndose un cambio cromático del amarillo a rosa o rojo, si la actividad de la ureasa es elevada. Es un examen sencillo, económico y rápido, con una sensibilidad y especificidad superior al 90% (Adelman, 1996; Matsukura, *et al.*, 1995; Mokuolu, *et al.*, 1997).

4.7.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La detección de *H. pylori* en las biopsias gástricas mediante la PCR proporciona resultados en corto tiempo. Se han desarrollado muchos protocolos para diferentes genes utilizando desoxioligonucleótidos específicos para *H. pylori* (Chisholm, *et al.*, 2001; Oleastro, *et al.*, 2003). Una de las ventajas que tiene es que no requiere condiciones de transporte tan estrictas. Permite utilizar el DNA para distintos estudios aparte del diagnóstico de la infección. Algunos estudios la encuentran igual de sensible que el cultivo a partir de biopsia gástrica. Actualmente se está utilizando la PCR a tiempo real que además permite la detección de cepas resistentes a antibióticos y la genotipificación (Oleastro, *et al.*, 2003).

En los últimos años se han desarrollado numerosas técnicas que permiten detectar la presencia del DNA de *H. pylori* directamente de la biopsia gástrica pero también de otras muestras como heces, saliva o agua (Simala-Grant, 2004). La mayoría de las técnicas se basan en la PCR, tanto clásica como a tiempo real. El objetivo ha sido el siguiente:

- **detección de genes específicos de la bacteria:** se han utilizado diversos protocolos como el estudio del gen de la ureasa, el gen de la glutamato racemasa (*glmA*) o el gen 16S RNAr, entre otros (Woo, 2009).
- **detección de factores de virulencia:** se pueden detectar la presencia de diferentes factores de virulencia, como los tipos del gen *vacA* (Chisholm, 2002; Yamazaki, 2005).
- **detección de mecanismos de resistencia:** la PCR, tanto clásica como en tiempo real, se ha utilizado con éxito para detectar la resistencia a claritromicina, puesto que son capaces de detectar mutaciones puntuales en el gen 23S RNAr, que confieren resistencia a este antimicrobiano. También se ha aplicado la PCR en tiempo real para detectar la resistencia a tetraciclina debida a mutaciones en el 16S DNAr en biopsias gástricas (Stone, 1997; Doorn, 2001; Owen, 2002; Alarcón, 2003).
- **como métodos de tipado:** para comparar aislamientos de *H. pylori* cultivados del mismo paciente o de familiares (Achtman, 1999).

4.7.4 Prueba rápida de la ureasa

H. pylori posee una ureasa que le capacita para la colonización y persistencia en la cavidad gástrica. Se localiza tanto en la membrana externa como en el espacio periplásmico y está compuesta por complejos de una estructura hexamérica. La enzima cumple tres funciones principales: protección frente al ácido de la mucosa gástrica, provisión de nitrógeno en forma de amonio y como factor de virulencia en la patogenia de la úlcera gástrica.

H. pylori descompone la urea en anhídrido carbónico y amoníaco, lo cual genera un pH básico que va a ponerse en evidencia mediante el cambio de color del medio de naranja-amarillo a rosa fuerte debido a la acción del indicador de pH.

La prueba de la ureasa rápida se puede realizar directamente con la muestra de biopsia gástrica, obtenida mediante endoscopia digestiva alta. Se recomiendan dos biopsias, una de cuerpo y otra de antro para el diagnóstico. Las muestras pueden ser inoculadas en la misma sala de endoscopias por lo que no necesitan ningún medio de transporte.

Existen diferentes reactivos comerciales dirigidos a detectar la enzima a partir de biopsia. Todos ellos contienen urea a diferentes concentraciones (se estima que hasta un máximo del 6% porque concentraciones superiores pueden inhibir la enzima) y un indicador de pH y varían en el diseño de los mismos: existen "test" de gelosa como Clotest®, HUTtest® y Hpfast® en los que la muestra se introduce en un medio semisólido que contiene los reactivos, "tests" de membrana, en los que los reactivos están contenidos en una tira de papel, como Pyloriteck® y Pronto Dry® y "tests" en medio líquido como Helicochek®.

En general son sistemas comerciales muy sencillos de utilizar y los resultados se interpretan en un intervalo corto de tiempo (media hora), y se observa el cambio en el color del reactivo. Los resultados de sensibilidad y especificidad son en general superiores al 80% y 90%, respectivamente.

También se puede utilizar una solución preparada en el laboratorio que contenga urea al 3-4% e indicador de pH, sin embargo los resultados de sensibilidad pueden ser algo menores. La solución se puede preparar con 60 g/L de urea, 0,012 g/L de rojo fenol, 2 g/L de KH_2PO_4 , 1 g/L de peptona, 5 g/L de NaCl y 10 g/L de glucosa en agua destilada (López-Brea, 2004).

4.7.5 Prueba del aliento (Urea Breath Test, UBT)

Es un método indirecto que se basa en la presencia de la ureasa de *H. pylori*. El paciente ingiere una solución con urea marcada con ^{13}C (no radioactivo) o ^{14}C (radioactivo) y se recoge el aliento 30 minutos después de la ingestión de la solución de urea; previamente se habrá recogido otra muestra de aliento basal. Si *H. pylori* se encuentra en el estómago, éste hidroliza la urea gracias a su ureasa y se libera CO_2 marcado (^{13}C o ^{14}C) que se absorbe, difunde a sangre y transporta a los pulmones y es liberado con el aliento.

Los resultados se miden como la relación de ^{13}C o $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ de la prueba con respecto al estándar. Tanto el sistema radiactivo como el no radiactivo presentan similares porcentajes de sensibilidad aunque generalmente se prefiere el no radiactivo si se dispone del espectrómetro de masas.

Estas pruebas tienen una excelente sensibilidad y especificidad para el diagnóstico y seguimiento del tratamiento antimicrobiano con la ventaja de ser una prueba global que valora la presencia de *H. pylori* en el estómago y no se ve sometido al sesgo que pueden tener otras pruebas por la distribución parcheada de la bacteria en el estómago. También tienen otras ventajas, como el ser una prueba no invasora y no depender de las condiciones de transporte, ni de la experiencia del personal técnico. La prueba del aliento indica una infección actual por la bacteria ya que en una infección pasada el resultado sería negativo. Por esto es útil como seguimiento del tratamiento realizado 4 a 6 semanas después de finalizado (López-Brea, 2004).

4.7.6 Serología

Los métodos serológicos se basan en la detección de anticuerpos específicos frente a *H. pylori* en suero, saliva u orina. La serología es útil en el estudio de poblaciones seleccionadas, sin embargo, su principal problema radica en que no puede diferenciar la infección activa de la exposición previa al microorganismo. *H. pylori* provoca una respuesta inmunitaria, tanto local como sistémica. El sistema inmune responde con un aumento transitorio de IgM, seguido de un aumento de anticuerpos de los tipos IgG e IgA que persisten durante la infección. Puesto que los anticuerpos IgM se detectan sólo transitoriamente, tienen poco valor para el diagnóstico. La principal respuesta sistémica es de tipo IgG por lo que la detección de estos anticuerpos es la más utilizada para el diagnóstico. La detección de anticuerpos específicos contra algunas proteínas del microorganismo, como CagA y VacA puede tener especial interés en estudios sobre virulencia. Puesto que la detección de anticuerpos depende del antígeno utilizado, considerando la heterogeneidad genética de *H. pylori* y las variaciones geográficas, algunos autores recomiendan el uso de mezclas de antígenos procedentes de varias cepas para mejorar la sensibilidad de estas técnicas así como su valoración en cada medio.

La técnica más utilizada es el EIA cuantitativo, que permite, además del diagnóstico primario, la monitorización del tratamiento. Las técnicas que detectan anticuerpos en saliva y en orina son atractivas, ya que estas muestras son fáciles de obtener, pero en ellas, la concentración de anticuerpos es más baja que en suero. Los métodos basados en la técnica del Western Blot se utilizan para el estudio de la respuesta frente a antígenos concretos, como CagA y VacA (López-Brea, 2004).

4.8 Tratamiento

La infección por *H. pylori* debe ser tratada con antibióticos como cualquier otra infección bacteriana. Sin embargo, con ningún antibiótico administrado por sí solo, se ha logrado una tasa significativa de erradicación, por lo que es necesario emplear dos antibióticos a los que sea susceptible la bacteria y terapias coadyuvantes como las que incrementan el pH del estómago (ya que varios de los antibióticos no son activos a pH bajo) o agentes antisecretores del ácido estomacal, principalmente los inhibidores de la bomba de protones (IBP) (Abdo y col., 2007, Mégraud, 2000).

El tratamiento de primera elección es la “triple terapia” que está integrada por un IBP y las siguientes combinaciones de antibióticos: 1) amoxicilina + claritromicina, 2) para áreas donde se tenga reportada la resistencia a claritromicina: amoxicilina + metronidazol y 3) en casos de alergia a penicilinas: metronidazol + claritromicina. El tiempo de administración puede variar pero generalmente abarca de 7 a 14 días. Para esta terapia se reportan fallas en la erradicación de *H. pylori* en más del 20%, principalmente debida a la resistencia de la bacteria frente a la claritromicina y/o metronidazol; no obstante, en la práctica clínica, este porcentaje va en aumento (Wannmacher, 2011). La segunda línea de tratamiento o “terapia cuádruple”, dependerá de la combinación de antibióticos utilizada inicialmente, pero generalmente este régimen está compuesto por un IBP, los antibióticos tetraciclina y metronidazol y se adicionan sales de bismuto, el tiempo de administración se puede prolongar hasta 21 días (Wannmacher, 2011). En aquellos pacientes en los que la infección por *H. pylori* persiste tras un segundo curso de tratamiento, deberán realizarse pruebas de susceptibilidad a la bacteria para elegir el antibiótico a emplearse en el tercer intento de erradicación (Malfertheiner, *et al.*, 2007). Los candidatos alternativos para esta tercera línea son las quinolonas (levofloxacina,

moxifloxacina), tetraciclina, rifabutina y furazolidona. Otra combinación que ha sido exitosa es amoxicilina y levofloxacina o rifabutina y elevadas dosis de IBP días (Wannmacher, 2011). Sin embargo, la prescripción de la rifabutina presenta el inconveniente de promover resistencia a micobacterias, además de que se han reportado casos de mielotoxicidad y toxicidad ocular (Malfertheiner, *et al.*, 2007), por lo que las terapias que incluyen a este antibiótico sólo deberán emplearse tras múltiples fallos previos en la erradicación cuando se administraron los otros antibióticos (Gisbert, 2008) y constituirán una cuarta línea de tratamiento. Una terapia recientemente empleada es la denominada sucesiva, cuyo fundamento es la administración de elevadas dosis consecutivas de antibióticos; la más común involucra 2 g de amoxicilina e IBP por 5 días, seguido de una triple terapia. Esta terapia ha demostrado tener tasas de erradicación mayores del 90% en Italia (Vakil and Mégraud, 2007). Finalmente, hay que enfatizar que la erradicación de *H. pylori* se recomienda únicamente en pacientes con padecimientos gastroduodenales como: úlcera péptica, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa, gastritis atrófica, pacientes con familiares en primer grado que tengan antecedentes de cáncer gástrico, pacientes con deficiencia de hierro (anemia) inexplicable y pacientes con púrpura trombocitopénica crónica idiopática (Malfertheiner, *et al.*, 2007).

4.9 Causas del fracaso de las terapias

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

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

sustancialmente la eficacia del tratamiento. La resistencia más común reportada para los antibióticos empleados en el tratamiento contra *H. pylori* se debe a mutaciones puntuales en el sitio blanco del fármaco (Mégraud, 2007). La resistencia emerge por presión de selección, eliminando rápidamente a las bacterias susceptibles y sólo sobreviven aquéllas con la mutación que les confiere resistencia. También se han reportado resistencias farmacológicas donde las cepas son susceptibles a un antibiótico *in vitro*, pero resistentes *in vivo* (Vakil and Mégraud, 2007). Las tasas de resistencia reportadas para amoxicilina y tetraciclinas son de alrededor del 5 y 4%, respectivamente (Vakil and Mégraud, 2007); mientras que para el metronidazol se reporta una resistencia promedio del 35%, siendo Japón el país con la menor resistencia (3%) y Kenia con la mayor (100%). Por otro lado, la resistencia para claritromicina puede ser tan baja como del 1% (Holanda) y tan elevada como del 48% (Turquía), con una media del 14% (Mégraud and Corti, 2009). Como se aprecia, el problema en la práctica clínica radica en la resistencia a estos dos últimos antibióticos (Horiki, *et al.*, 2009). En México, Torres y col. reportaron una resistencia a metronidazol del 80% en 1997, Garza-González del 37.1% en el 2002 (Garza-González y col., 2002) y Chihu y col., del 58% en el 2005 (Chihu, *et al.*, 2005). Para claritromicina se reportó una resistencia del 24%. En cuanto a las fluoroquinolonas, existe una tendencia creciente en la adquisición de resistencia en países como Portugal y Japón 5.3% y 5.5% (Fujimura, *et al.*, 2004), respectivamente. Finalmente para rifampicinas, en Alemania se ha reportado un 1.4% de resistencia (Glocker, *et al.*, 2008). Actualmente, se recomienda que si la tasa de resistencia local a claritromicina sobrepasa el 20%, no debe emplearse este agente (Malfertheiner, *et al.*, 2007). Otra observación importante respecto al metronidazol es que la resistencia a este antibiótico *in vitro* no siempre predispone a la falla del tratamiento (Rautelin,

et al., 1992). El uso de un esquema adecuado de erradicación de *H. pylori*, debería tener éxito en un porcentaje superior al 90%. De hecho, la Asociación Americana de Gastroenterología, recomienda utilizar en primera instancia solamente esquemas que hayan demostrado una eficacia por encima del 85% (Graham, *et al.*, 2007).

b) Otros factores del fracaso de las terapias

La falta del cumplimiento adecuado de los tratamientos por parte del paciente, es un factor vital en las bajas tasas de erradicación de la bacteria. La causa de esto es la complejidad de la terapia, que involucra por lo menos 3 fármacos, administrados en repetidas dosis, durante un largo periodo de tiempo. Debido a lo anterior, se presentan efectos secundarios que, aunados a una falta de mejoría inmediata, desmotivan al paciente a continuar con la terapia. Dentro de los efectos secundarios más frecuentes se reportan la diarrea, en un 30% de los pacientes, y el mal sabor de boca (Vakil and Mégraud, 2007). Por otro lado, los efectos adversos más comunes son: náusea y vómito (5%), salpullido (2%), cefalea (4%), malestar o dolor abdominal (5%) y estomatitis (3%) (Ford, *et al.*, 2006).

4.10 Los Productos Naturales

4.10.1 Metabolismo

Para poder vivir, crecer y reproducirse los organismos necesitan transformar una gran variedad de compuestos orgánicos. Estas transformaciones requieren energía que la obtienen en forma de ATP y la presencia de sistemas enzimáticos. El conjunto

de reacciones específicas mediante el cual un organismo fabrica sus propias sustancias y mantiene la vida se conoce como metabolismo (Dewick, 2009; Gutiérrez y col., 2009; Ávalos y col., 2009).

Las moléculas más importantes para la vida son las proteínas, los hidratos de carbono, las grasas y los ácidos nucleicos. A pesar de las características extremadamente diferentes de los distintos seres vivos, las rutas generales para modificar y sintetizar estas sustancias son esencialmente las mismas para todos con muy pequeñas modificaciones. Estos procesos se conocen como metabolismo primario y los compuestos implicados en las diferentes rutas se conocen como metabolitos primarios (Dewick, 2009; Gutiérrez y col., 2009; Ávalos y col., 2009).

Pero a diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa de carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, y que se denominan metabolitos secundarios (Maschek y Baker, 2008; Ávalos y col., 2009).

Se denomina metabolismo secundario al conjunto de procesos en el que participan éstos compuestos y cuya distribución es mucho más limitada y específica según el ser vivo (Dewick, 2009; Gutiérrez y col., 2009).

Los metabolitos secundarios se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos, presentan propiedades biológicas, muchos desempeñan funciones

ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros. Estos compuestos reciben también la denominación de productos naturales (Gutiérrez y col., 2009; Ávalos y col., 2009).

La formación de los metabolitos secundarios en la Naturaleza tiene lugar a partir de los metabolitos primarios. La síntesis de los productos naturales comienza con la fotosíntesis que tiene lugar en plantas superiores, algas y algunas bacterias. Es un proceso endotérmico que requiere de la luz solar (Fig. 4). Aquellos organismos incapaces de absorber la luz obtienen su energía de la degradación de carbohidratos (Gutiérrez y col., 2009; Ávalos y col., 2009).

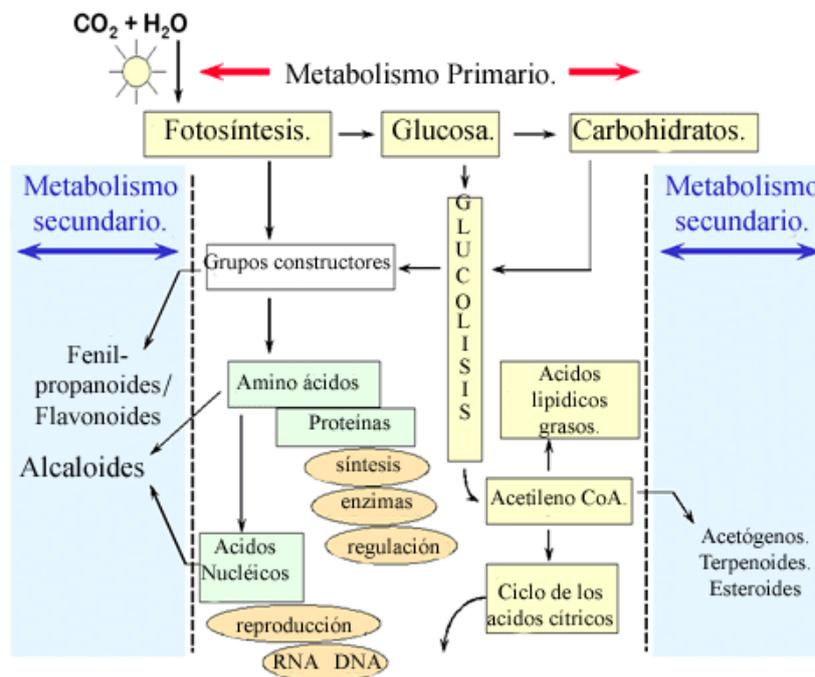


Figura 4. Metabolismo primario y relación con el metabolismo secundario de plantas

Existen tres intermedios químicos principales como son el acetil-CoA, el ácido shikímico y el ácido mevalónico, a partir de estos compuestos se biosintetizan los principales grupos de productos naturales como son los ácidos grasos, antraquinonas, terpenos, esteroides, alcaloides, cumarinas, lignanos, etc. (Fig. 5). Algunos esqueletos de productos naturales se biosintetizan utilizando fragmentos que provienen de más de una ruta específica tal es el caso de los flavonoides que se forman a partir de la ruta del acetato y del ácido shikímico. A estos compuestos se les denomina de biogénesis mixta (Gutiérrez y col., 2009).

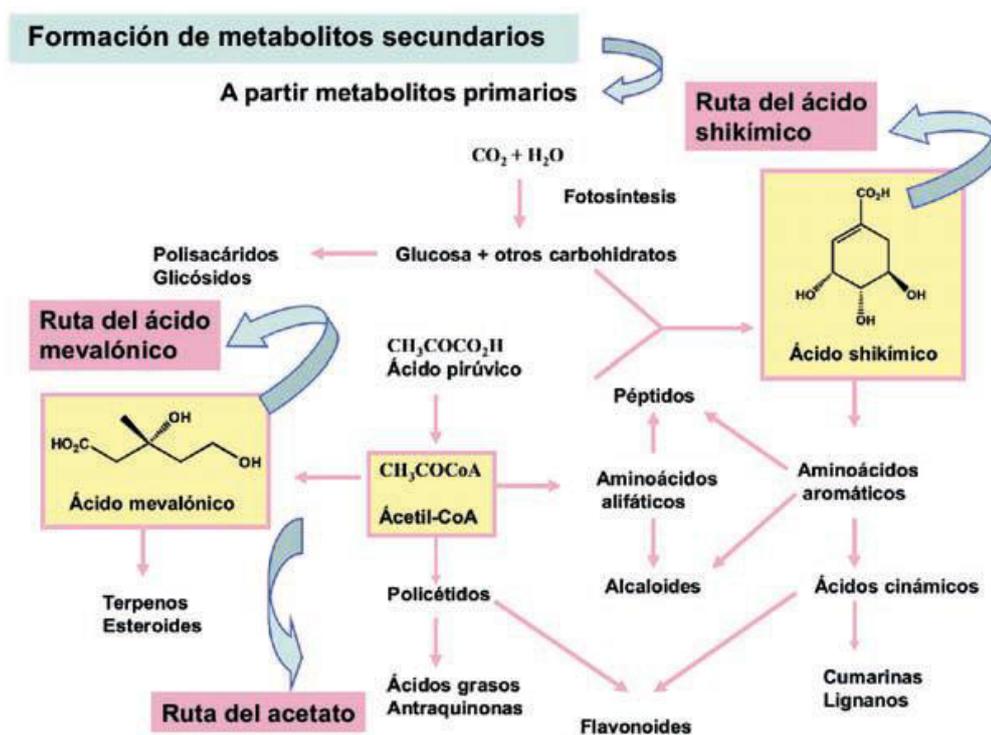


Figura 5. Origen de metabolitos secundarios a partir de metabolitos primarios

4.10.2 Clasificación de los metabolitos secundarios

Los compuestos secundarios de plantas de interés comercial, han sido incluidos en tres principales categorías según sus rutas biosintéticas: terpenos, compuestos fenólicos y compuestos nitrogenados (Chinou, 2008; Ávalos y col., 2009).

4.10.2.1 Terpenos

Los terpenos, o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40.000 moléculas diferentes). Suelen ser insolubles en agua y se forman por la polimerización de unidades de isoprenos y esteroides (Sarin, 2005; Ávalos y col., 2009). De esta forma, los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno (C₅) que contienen en seis grupos: los terpenos de 10 C contienen dos unidades C₅ y se llaman monoterpenos; los de 15 C tienen tres unidades de isopreno y se denominan sesquiterpenos, y los de 20 C tienen cuatro unidades C₅ y son los diterpenos. Los triterpenos tienen 30 C, los tetraterpenos tienen 40 C y se habla de politerpenos cuando contienen más de 8 unidades de isopreno. Dentro de éstos terpenos se encuentran carotenos, glicósidos cardiotónicos, taxol, entre otros (Shilpa, *et al.*, 2010; Ávalos y col., 2009).

Muchos terpenoides son comercialmente interesantes por su uso como aromas y fragancias en alimentación y cosmética, o por su importancia en la calidad de productos agrícolas. Otros compuestos terpenoides tienen importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalariales, antimicrobianas, etc. (Pérez y Jiménez, 2011).

Los terpenos que se encuentran en los aceites esenciales son generalmente monoterpenos, como el limoneno y el mentol, (Fig. 6), principales monoterpenos constituyentes de los aceites de limón y menta, respectivamente (Ávalos y col., 2009).

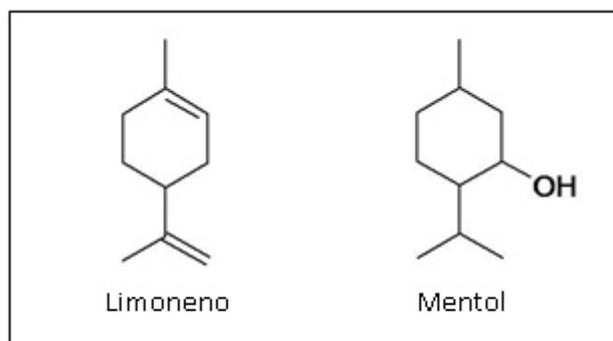


Figura 6. Estructura química del limoneno y mentol

Por otra parte, la resina de ciertas coníferas contiene monoterpenos que actúan como insecticidas. Es el caso de los metabolitos pineno y piretrina (Fig. 7).

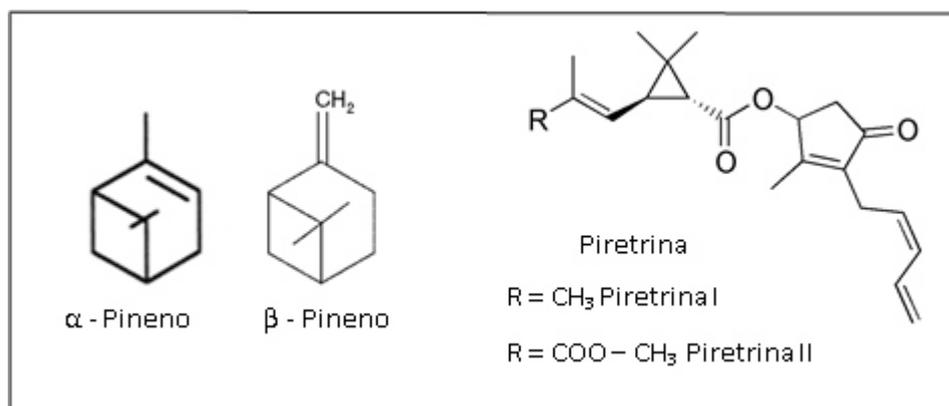


Figura 7. Estructura química de los monoterpenos pineno y piretrina

Entre los diterpenoides se encuentran las giberelinas y el fitol, un diterpeno de cadena abierta que forma parte de la estructura de las clorofilas (Fig. 8).

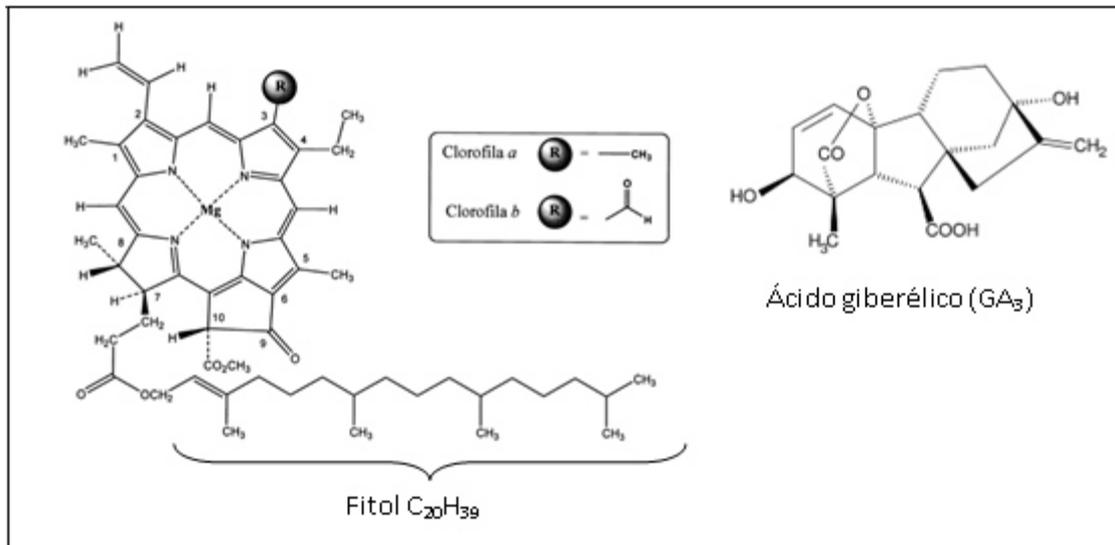


Figura 8. Estructura química del ácido giberélico y del fitol

Entre los Triterpenos se encuentran esteroides y esteroles derivados del escualeno, una molécula de cadena lineal de 30 C de la que derivan todos los triterpenos cíclicos. Los esteroides que contienen un grupo alcohol, y es el caso de casi todos los esteroides vegetales, se denominan esteroles. Los más abundantes en plantas son el estigmasterol y el sitosterol, que sólo difiere del estigmasterol en la ausencia del doble enlace entre C 22 y C 23 (Fig. 9).

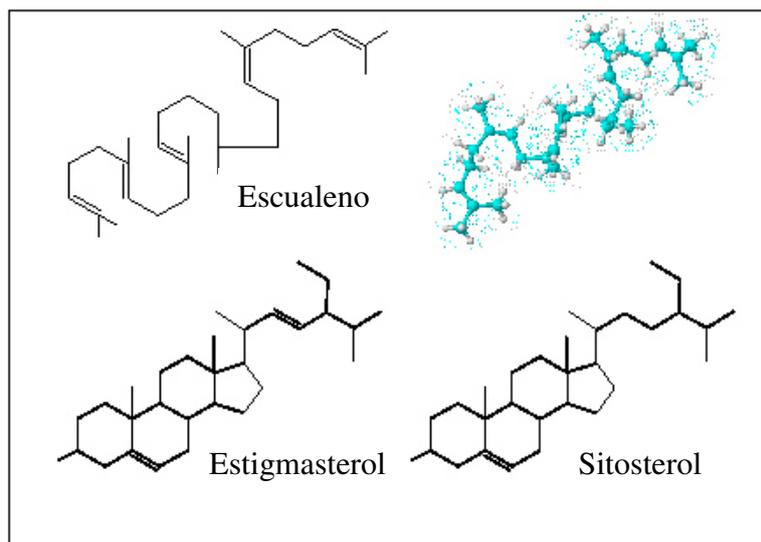


Figura 9. Molécula de escualeno y sus derivados triterpenos cíclicos estigmasterol y sitosterol

El esteroles más abundante de animales es el colesterol (Fig. 10), presente también en plantas aunque en trazas, razón por la cual los aceites vegetales se etiquetan como “libres de colesterol”.

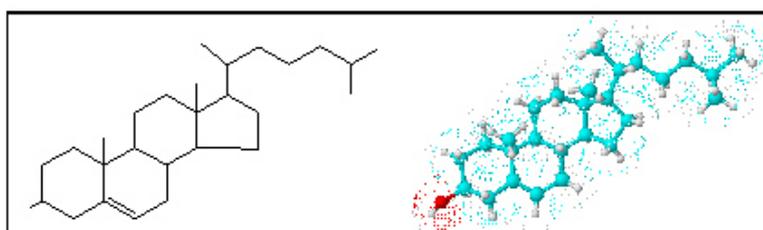


Figura 10. Estructura química del colesterol

La principal función de los esteroides en plantas es formar parte de las membranas y determinar su viscosidad y su estabilidad. Algunos esteroides tienen funciones protectoras frente a insectos como en el caso de la ecdisona aislada del helecho común (Fig. 11a). Los limonoides también son triterpenos, las sustancias amargas de

los cítricos que actúan como antiherbívoros. Un limonoide de los más poderosos repelentes de insectos es la azadiractina (Fig. 11b) que se usa en la industria alimentaria y en agronomía para el control de plagas. Entre los triterpenos se encuentran algunos esteroides en forma de glicósidos. Estos glicósidos esteroideos, con importantes funciones en medicina y en la industria (cardenólidos y saponinas), se consideran más adelante en el apartado de glicósidos (Ávalos y col. 2009).

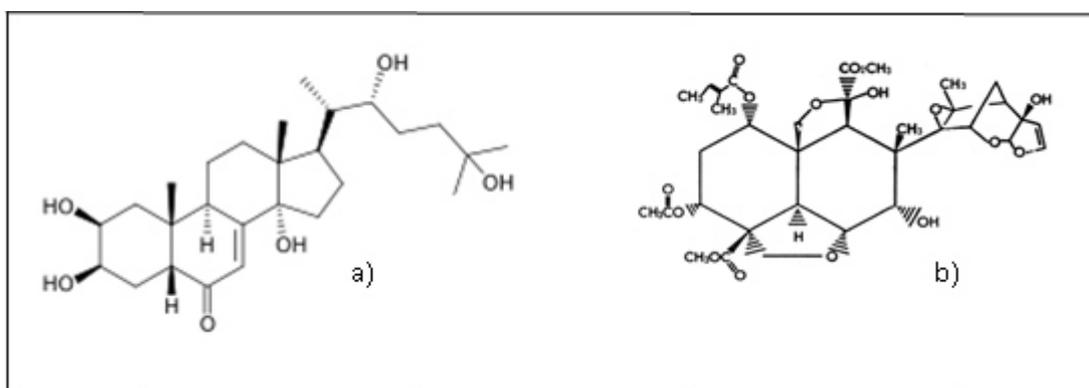


Figura 11. Estructuras químicas de la Ecdisona a) y de la Azadiractina b)

Los terpenos de mayor tamaño son los tetraterpenos y politerpenos, entre los que se encuentran los carotenoides (tetraterpenos) (Fig. 12) y los hidrocarburos de alto peso molecular caucho y gutapercha (politerpenos o poliisoprenoides).

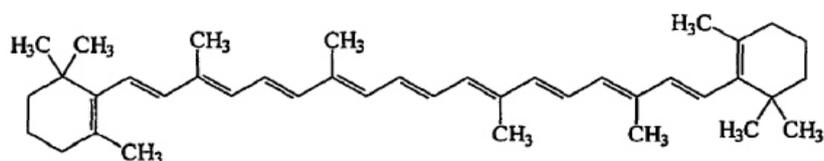


Figura 12. Estructura química del β - caroteno

El caucho (cis-1,4-poliisopreno), constituido por entre unos 1500 y 60000 residuos de isopreno aproximadamente y la gutapercha (guta, la misma estructura del caucho, algo menor de tamaño, y con los dobles enlaces en configuración trans,) se acumulan en forma de partículas en el látex cuya composición es 30 - 40% caucho y 50% agua, resultando una mezcla compleja de terpenos, resinas, proteínas y azúcares (Fig. 13).

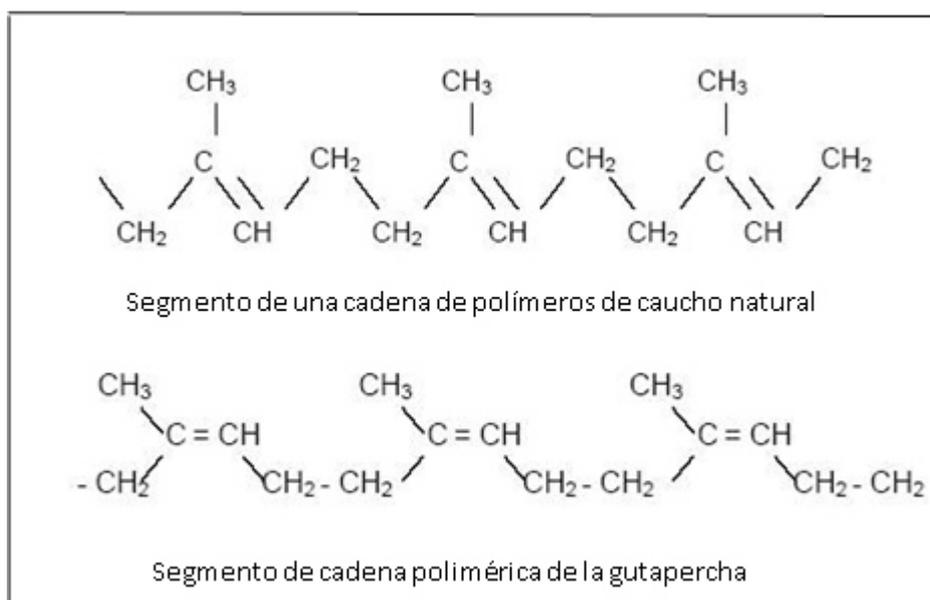


Figura 13. Caucho y gutapercha

4.10.2.2 Compuestos fenólicos

Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol (Fig. 14). Estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides y derivan todas ellas del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo (Ávalos y col., 2009).

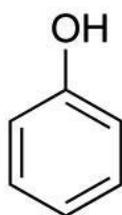


Figura 14. Estructura química del fenol

Desde el punto de vista de la estructura química, son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos, cumarinas y la lignina. En el grupo también se encuentran pigmentos flavonoides (Ávalos y col., 2009).

Las aplicaciones farmacéuticas de estos compuestos son considerables, se refieren sus efectos como analgésicos, antibacterianos, antihepatotóxicos, antioxidantes, antitumorales, inmunoestimulantes, entre otras (Gurib - Fakim, 2006).

Existen dos rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: la ruta del ácido siquímico y la ruta del ácido malónico. La ruta del ácido malónico es una fuente importante de fenoles en hongos y bacterias, pero es poco empleada en plantas superiores. La ruta del ácido siquímico es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos de plantas. La mayoría de los compuestos fenólicos derivan de la fenilalanina (Ávalos y col., 2009).

Las cumarinas son una amplia familia de las que más de 1500 han sido identificadas en más de 800 especies de plantas, que actúan como agentes antimicrobianos y como inhibidores de germinación. La cumarina más simple es la que se encuentra como constituyente en el aceite de bergamota, un aceite esencial que aporta aroma al tabaco de pipa, té y a otros productos. Las más tóxicas son producidas por hongos, por ejemplo, la aflatoxina producida por *Aspergillus flavus* (puede infectar cacahuete o maíz), quizá el carcinogénico más potente de las toxinas naturales (Ávalos y col., 2009).

Entre los compuestos fenólicos también se encuentran los derivados del ácido benzoico que tienen un esqueleto formado por fenilpropanoides que han perdido un fragmento de dos carbonos de la cadena lateral. Ejemplos de estos derivados son la vainillina y el ácido salicílico (actúa como regulador del crecimiento vegetal, implicado en la resistencia de la planta frente a patógenos) (Ávalos y col., 2009).

La lignina es un polímero altamente ramificado de fenilpropanoides. Después de la celulosa, es la sustancia orgánica más abundante en las plantas. Se encuentra covalentemente unida a la celulosa y a otros polisacáridos de la pared celular. Es insoluble en agua y en la mayoría de los solventes orgánicos lo que hace muy difícil su extracción sin degradarla. También tiene función protectora dado que su resistencia mecánica evita que las plantas sean alimento para animales y, además, su naturaleza química hace que sea difícil digerirla por los herbívoros (Ávalos y col., 2009).

Entre los compuestos fenólicos también se encuentran los flavonoides. Su esqueleto carbonado contiene 15 carbonos ordenados en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos. Se clasifican en función del grado de oxidación del puente de tres carbonos, siendo los principales antocianinas (pigmentos), flavonas, flavonoles e isoflavonas. Entre sus funciones se encuentra la defensa y la pigmentación (Ávalos y col., 2009).

Las antocianinas son flavonoides pigmentados responsables de la mayoría de los colores de las flores y los frutos. Por ello son importantes en la polinización y en la

dispersión de semillas. Son glicósidos con un azúcar en posición 3. Cuando las antocianinas carecen de azúcar se denominan antocianidinas. En las flores también se encuentran flavonas y flavonoles que absorben a longitudes de onda más cortas que las antocianinas por lo que no son visibles para el ojo humano. Sin embargo los insectos que ven en el rango del UV responden a flavonas y flavonoles como señales de atracción (Ávalos y col., 2009).

Los taninos son compuestos fenólicos poliméricos que se unen a proteínas desnaturalizándolas. El nombre de tanino procede de la antigua práctica de utilizar extractos vegetales para convertir la piel animal en cuero (en el curtido, se unen al colágeno aumentando su resistencia al calor, al agua y a microorganismos). Existen dos categorías: taninos condensados y taninos hidrolizables. Los taninos condensados son polímeros de unidades de flavonoides unidas por enlaces C-C, los cuales no pueden ser hidrolizados pero sí oxidados por un ácido fuerte para rendir antocianidinas. Los taninos hidrolizables son polímeros heterogéneos que contienen ácidos fenólicos, sobre todo ácido gálico y azúcares simples; son más pequeños que los condensados y se hidrolizan más fácilmente (Ávalos y col., 2009).

4.10.2.3 Alcaloides

Los compuestos nitrogenados son principalmente los alcaloides y glucósidos cianogénicos.

Los alcaloides son un grupo diverso de compuestos con cerca de 4 000 estructuras conocidas. Estos son fisiológicamente activos en humanos (cocaína, nicotina,

morfina) y por supuesto de gran interés en la industria farmacológica (Sajc, *et al.*, 2000). Son una gran familia de más de 15.000 metabolitos secundarios que tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica. La mayoría son heterocíclicos aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos) como la mescalina o la colchicina, por ejemplo. Se encuentran en el 20% aproximadamente de las plantas vasculares, la mayoría dicotiledóneas herbáceas (Ávalos y col., 2009).

En humanos, los alcaloides generan respuestas fisiológicas y psicológicas, la mayoría de ellas consecuencia de su interacción con neurotransmisores. A dosis altas, casi todos los alcaloides son muy tóxicos. Sin embargo, a dosis bajas tienen un alto valor terapéutico, como relajantes musculares, tranquilizantes, antitusivos o analgésicos. Se sintetizan normalmente a partir de lisina, tirosina y triptófano, aunque algunos como la nicotina y compuestos relacionados derivan de la ornitina. El opio es quizá uno de los primeros alcaloides conocidos, el exudado (látex) de la cápsula inmadura de *Papaver somniferon*. Este exudado contiene una mezcla de más de 20 alcaloides diferentes entre los que se encuentran la morfina y la codeína. Ambos alcaloides pertenecen a un grupo denominado alcaloides isoquinolínicos que sintetizan a partir de la reticulina. La heroína es un alcaloide semisintético formado por acetilación de la morfina. Los alcaloides se clasifican en función de los anillos presentes en la molécula (Ávalos y col., 2009).

4.10.2.4 Glicósidos

Los glicósidos son metabolitos vegetales de gran importancia, se consideran posiblemente, los metabolitos secundarios con mayor relación en las funciones de defensa (Bennett y Wallsgrove, 1994).

Su nombre hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo. Existen tres grupos de glicósidos de particular interés: saponinas, glicósidos cardíacos y glicósidos cianogénicos. Una cuarta familia, los glucosinolatos, se incluyen en este grupo debido a su estructura similar a los glicósidos (Ávalos y col., 2009).

Las saponinas son metabolitos secundarios que se encuentran como glicósidos esteroideos, glicósidos esteroideos alcaloides o bien glicósidos triterpenos, están ampliamente distribuidos en las plantas superiores y presentes también en algunos invertebrados marinos. Son por tanto triterpenoides o esteroides que contienen una o más moléculas de azúcar en su estructura (Hostettmann, *et al.*; 2002; Vincken, *et al.*; 2007; Augustin, *et al.*; 2011).

Las saponinas triterpenoides se encuentran principalmente en plantas dicotiledóneas, pero también en algunas monocotiledóneas. Mientras que las saponinas esteroideas se producen principalmente en plantas dicotiledóneas, tales como las Liliaceae, Dioscoraceae y Agavaceae (Dewick, 2009).

El nombre saponina proviene de la palabra en Latin *sapo* (soap en inglés) y hace alusión a las propiedades detergentes de esta familia de compuestos y a su capacidad para formar espumas estables al agitar sus disoluciones acuosas (Domínguez, 1985;

Hostettmann, *et al.*; 1995). El comportamiento en agua se explica por su naturaleza anfifílica, resultado de la adición de un grupo hidrofílico (azúcar) a un terpenoide hidrofóbico (Pérez, 2012).

Las saponinas se pueden presentar como agliconas, es decir, sin el azúcar (el terpeno sin el azúcar, por ejemplo), en cuyo caso se denominan geninas o sapogeninas (Fig. 15) (Vasilyeva, *et al.*, 2000; Ávalos y col., 2009; Pérez, 2012).

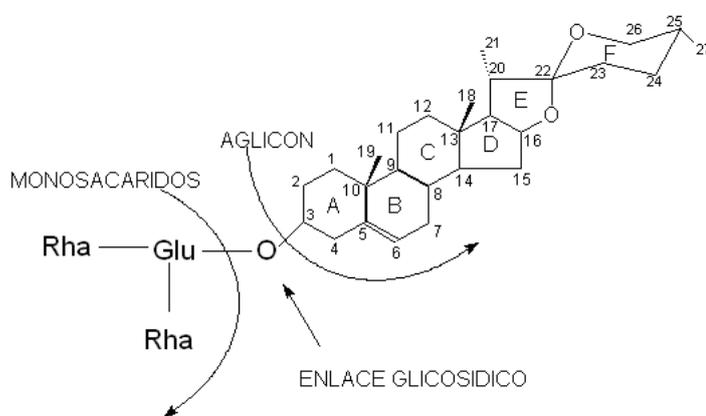


Figura 15. Estructura química de las saponinas

Dependiendo del tipo de genina presente, las saponinas se dividen en tres clases fundamentales: glicósidos esteroidales, triterpénicos o alcaloides-esteroidales (Fig. 16).

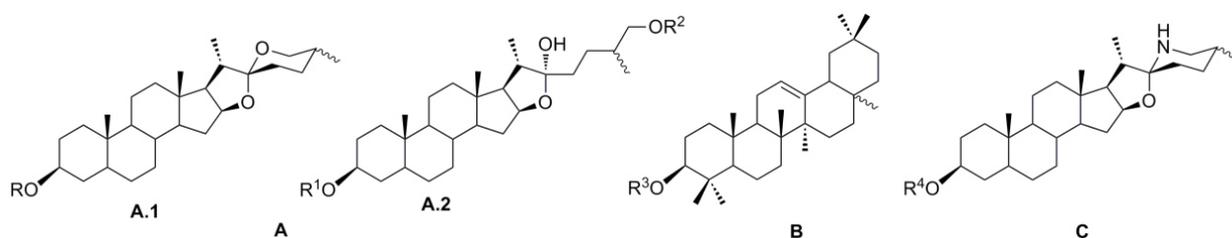


Figura 16. Clasificación de las saponinas de acuerdo al tipo de genina presente: A) esteroidales [A.1 espiroestánica, A.2 furoestánica], B) triterpénica y C) alcaloide - esteroidal

Las saponinas tienen en común la unión de una o más cadenas de azúcares al aglicón. Las saponinas monodesmosídicas poseen solo una cadena, generalmente enlazada al C-3 de la genina (Fig. 17, D). Las bidesmosídicas presentan dos, usualmente con una enlazada al C-3 a través de un enlace tipo éter; mientras que la otra puede estar enlazada al C-28 mediante un enlace tipo éster (en saponinas triterpénicas, E) o al C-26 mediante un enlace tipo éter (en saponinas furostánicas, F). Las saponinas tridesmosídicas son poco abundantes en la naturaleza (Pérez, 2012).

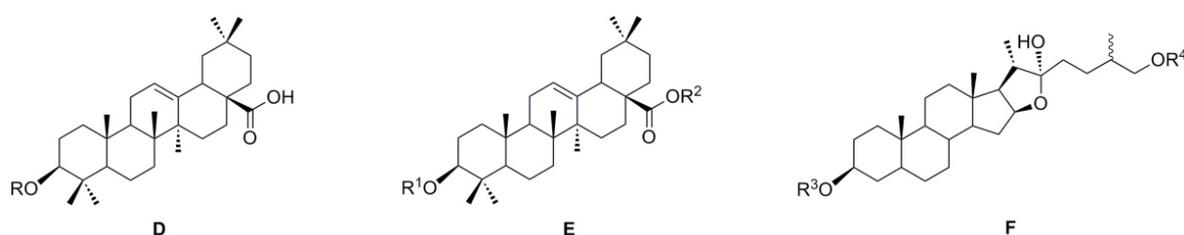


Figura 17. Ejemplos de saponinas mono y bidesmosídicas

La porción de carbohidrato está formada por oligosacáridos de cadenas cortas, lineales o ramificadas. Entre los monosacáridos que se presentan con más frecuencia están la D-glucosa, D-galactosa, L-ramnosa, D-xilosa y ácido D-glucurónico (Francis, 2002). A la complejidad estructural de esta familia de compuestos contribuyen, por una parte, la presencia de diferentes sustituyentes, grupos funcionales y variabilidad en la cadena lateral del aglicón y por otra; la naturaleza, número y secuencia de los monosacáridos que forman la porción oligosacáridica. Esto justifica la diversidad de propiedades fisiológicas, inmunológicas y farmacológicas de estas sustancias (Francis, 2002).

Las saponinas causan hemólisis, lisis de glóbulos rojos, incrementando la permeabilidad de la membrana del plasma y así son altamente tóxicos cuando son

inyectados a la corriente sanguínea. La lisis de eritrocitos es una de las propiedades biológicas más generalizadas dentro de esta familia de compuestos (Gauthier, *et al.*, 2009; Dewick, 2009). Sin embargo, las saponinas son relativamente dañinas cuando se toman oralmente, y algunos de nuestros productos alimenticios por ejemplo, frijoles, lentejas, soya, espinacas y avenas, contienen significativo contenido de ellas (Dewick, 2009)

Muchas saponinas exhiben importantes actividades biológicas (Sparg, *et al.*, 2004; Song, *et al.*, 2009; Hostettmann, *et al.*, 2002; Yao, *et al.*, 2000; Martínez, 2001) y por ello atraen la atención de la comunidad científica como compuestos de partida para el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos. Resaltan las actividades antibacteriana (De Leo, *et al.*, 2006; De Leo, *et al.*, 2001); antiinflamatoria (Sparg, *et al.*, 2004); antifúngica (Sparg, *et al.*, 2004; Zhang, *et al.*, 2005; Coleman, *et al.*, 2010; Miyakoshi, *et al.*, 2000); antiparasitaria, fundamentalmente contra *Plasmodium falciparum* (Traore, *et al.*, 2000) y *Leishmania infantum* (Delmas, *et al.*, 2000); antiviral (Sparg, *et al.*, 2004; Zhao, *et al.*, 2008); citotóxica (Sparg, *et al.*, 2004; Man, *et al.*, 2010; Ikeda, *et al.*, 2003; Mimaki, *et al.*, 2001; Yao, *et al.*, 2000) y antitumoral (Sparg, *et al.*, 2004) de gran número de estos compuestos.

Las saponinas son compuestos que han presentado una buena respuesta en ensayos de citotoxicidad, estos metabolitos han mostrado tener un potencial importante de actividad citotóxica. Numerosos reportes destacan las propiedades citotóxicas de muchas saponinas. Sin embargo, las saponinas con gran citotoxicidad no siempre tienen propiedades antitumor (Sparg, *et al.*, 2004).

Recientemente se describió que dos saponinas esteroideas sintéticas presentan una potente actividad inhibitoria contra el virus H5N1 (virus de influenza aviar) (Song, *et al.*, 2009).

Se conoce además, que algunas saponinas activan el sistema inmunológico, por lo que se utilizan como adyuvantes en la formulación de vacunas (Sun, *et al.*, 2009). La saponina QS-21, una compleja saponina triterpénica que contiene dos oligosacáridos en su estructura (Evans, *et al.*, 2001) se ha empleado en la formulación de vacunas – ensayadas en humanos– contra VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana) y contra diferentes tipos de cáncer (Livingston, *et al.*, 1994; Chapman, *et al.*, 2000).

Hasta aquí se ha visto que las saponinas presentan un amplio espectro de actividades biológicas, sin embargo, sus propiedades citotóxicas son de las más estudiadas y aparecen resumidas en numerosos artículos de revisión (Man, *et al.*, 2010; Rao, *et al.*, 1995; Konoshima, 1996; Kim, *et al.*, 2008; Bachran, *et al.*, 2008; Fuchs, *et al.*, 2009).

En los últimos diez años se han publicado varios trabajos relacionados con el aislamiento de saponinas esteroideas de numerosas especies de plantas (Mimaki, *et al.*, 1998; Mimaki, *et al.*, 2000; Yokosuka, *et al.*, 2000; Yang, *et al.*, 2006; Yokosuka, *et al.*, 2009).

Los glicósidos cardiacos o cardenólidos son semejantes a las saponinas esteroideas, tienen también propiedades detergentes, pero su estructura contiene una lactona. Se encuentran de forma natural en forma de glicósidos o de agliconas.

Quizá el más conocido sea la digitoxina, o su análogo digoxina, aislada de *Digitalis purpurea* y utilizada como medicamento en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva (Fig. 18).

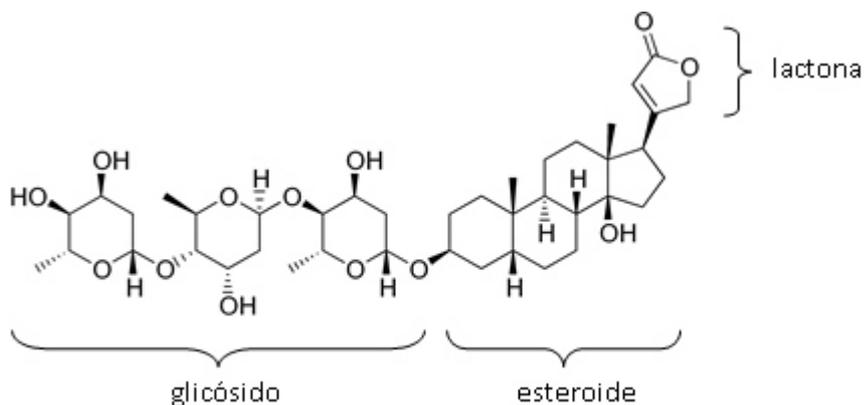


Figura 18. Estructura de la digitoxina de *Digitalis purpurea*

Los glicósidos cianogénicos son compuestos nitrogenados, que no son tóxicos por sí mismos pero se degradan cuando la planta es aplastada liberando sustancias volátiles tóxicas como cianuro de hidrógeno (HCN). Los glicósidos cianogénicos normalmente no se degradan cuando la planta está intacta. Tienen un papel protector en algunas especies frente a herbívoros. El cianuro de hidrógeno es una toxina de acción rápida que inhibe metaloproteínas como la citocromo oxidasa, enzima clave en la respiración mitocondrial. Sin embargo, algunos herbívoros llegan a adaptarse a alimentarse de plantas cianogénicas y tolerar más altas dosis de HCN (Ávalos y col., 2009).

Los glucosinolatos, también llamados glicósidos del aceite de mostaza, se degradan y desprenden sustancias volátiles responsables del aroma, el olor y el gusto de condimentos como la mostaza y de vegetales como el repollo, brócoli o coliflor

(*Brassicaceae*). La sinigrina es el glucosinolato que se encuentra en las semillas de mostaza negra (*Brassica negra*). Los glucosinolatos al igual que los glicósidos cianogénicos, están separados espacialmente de las enzimas hidrolíticas que los degradan y actúan también como repelentes de herbívoros (Ávalos y col., 2009).

4.11 Importancia de los productos naturales en el desarrollo de fármacos

Hoy en día, los sistemas de medicina tradicional basados en el uso de especies vegetales gozan de un gran respeto, especialmente en países con economías emergentes donde la disponibilidad de los servicios médicos y la accesibilidad a los tratamientos alopáticos es limitada (Shahid, *et al.*, 2009).

En la naturaleza existen innumerables metabolitos secundarios con distintas propiedades biológicas, que los hacen valiosos como base estructural para el descubrimiento de fármacos (Jaki, *et al.*, 2008).

Se estima que más de 100 000 metabolitos secundarios son producidos por las plantas (Bhalla, *et al.*, 2005). Aproximadamente 1 600 estructuras químicas nuevas obtenidas a partir de plantas superiores se describen cada año, de las cuales un gran número tiene actividad biológica (Sajc, *et al.*, 2000; Fiehn, 2002). Esto hace que el estudio de los metabolitos presentes en las plantas sea un enorme reto, de ahí la necesidad de utilizar tecnologías diversas para su producción, caracterización e identificación.

La demanda de productos naturales de interés farmacéutico provenientes de plantas se ha incrementado en los últimos años dada la limitación de los procesos de

obtención de medicamentos basados en la síntesis química (Pezzuto, 1995). A esto se le suma la gran diversidad química de estos sobre los compuestos sintéticos y la intensa actividad biológica como resultado de la selección natural (Guttman, *et al.*, 2004). Adicionalmente, el costo de los biofármacos limita su disponibilidad en un amplio sector del mercado y no satisface las necesidades de la población mundial (Gleba, *et al.*, 1999). Otro aspecto de gran interés ha sido que muchas especies vegetales están en peligro de extinción o se han extinguido debido a los problemas ambientales provocados por el hombre y a la sobreexplotación de las fuentes naturales (Makunga y van Staden, 2008).

Aunque gran parte de los medicamentos se obtienen por síntesis química, la mayoría de las estructuras principales están basadas en productos naturales. Mundialmente existe un 44% de nuevos medicamentos basados en productos naturales y en países desarrollados el 25% de los medicamentos son derivados de plantas (Haq, 2004). Se conoce que en la producción de medicamentos, según Hostettmann, *et al.* (2000), el 11% representa productos naturales (extractos de plantas), 24% son productos de origen natural, es decir que para la síntesis de compuestos utilizan precursores de origen natural y el 9% son copias sintéticas de productos naturales. Tal es su importancia, que aproximadamente el 60% de compuestos anticancerígenos y el 75% de medicamentos contra enfermedades infecciosas son productos naturales o derivados de estos (Cragg y Newman, 2005).

En un estudio reciente se ha analizado el origen de los nuevos fármacos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) entre 1981 y 2008. De este estudio se desprende que un 57.7% se corresponden con Productos Naturales, entendiendo como tal a los propiamente llamados así, a sus derivados y a los mímicos de los mismos (Fig. 19).

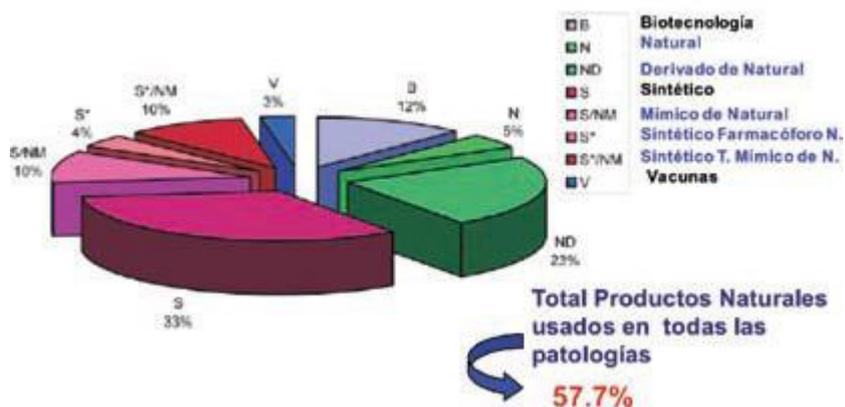


Figura 19. Total de nuevos fármacos 1982 - 2008

Los metabolitos secundarios han tenido un extenso uso en el tratamiento de enfermedades. Estos compuestos han servido en su forma original y como modelo para modificaciones sintéticas. Entre el año 2000 y el 2005, más de 20 nuevos fármacos basados en productos naturales fueron lanzados al mercado. Estos compuestos de estructuras diversas, junto con un número de productos naturales que actualmente se encuentran en etapas de ensayo clínico demuestran la importancia de las fuentes naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos (Chin, *et al.*, 2006).

La estrategia más utilizada para el estudio de productos naturales es el tamizaje biológico. Para el tamizaje de productos naturales es esencial el empleo de bioensayos. La selección de un sistema de ensayos para monitorear el fraccionamiento se basa en la actividad que demuestre el extracto. Generalmente se utilizan sistemas de prueba *in vitro* para monitorear la actividad, ya que los resultados se obtienen de manera más rápida que con las pruebas *in vivo* y también los costos del bioensayo son menores (Bhakuni and Rawat, 2005). El ensayo antibacteriano *in vitro*, es simple, rápido, eficiente, confiable, sensible, seguro

relativamente de bajo costo (Sarker, *et al.*, 2007). La actividad antimicrobiana se considera indicador de la capacidad de síntesis de metabolitos secundarios bioactivos (Del Val, *et al.*, 2001). Este método clásico requiere que las sustancias a probar sean solubles en agua o puedan difundirse en agar (Murillo-Álvarez, *et al.*, 2001). Existen varios métodos para realizar este ensayo, pero el método de difusión en disco es uno de los más utilizados, ya que a través de él, la sensibilidad de un cultivo se puede determinar con facilidad y en poco tiempo (Brock and Madigan, 1993).

4.12 Técnicas para la extracción, purificación y caracterización estructural de compuestos

En la investigación fitoquímica principalmente se utilizan métodos de separación, fundamentalmente cromatográficos, y métodos de elucidación estructural, principalmente espectroscópicos. La experimentación con la planta comienza con la extracción de los metabolitos que se encuentren disueltos en el citoplasma de la célula vegetal o formando sales que se encuentran incrustadas en las células. Después de triturada la planta se lleva a un proceso de maceración en donde el material vegetal está en contacto con un disolvente. Otro método de extracción de compuestos es utilizando diferentes disolventes con polaridad creciente empezando con hexano y aumentando la polaridad hasta llegar al acetato de etilo para arrastrar sustancias de polaridad intermedia, terminando con el empleo de alcohol que extrae del vegetal compuestos más polares. Este procedimiento ayuda a que la extracción con diferentes polaridades arrastre diferentes metabolitos secundarios y de esta forma poder purificarlos más fácilmente (Villar del Fresno, 1999).

Una de las tareas más importantes en la química de productos naturales es la determinación de las estructuras orgánicas. Cuando se aísla un compuesto potencialmente útil, de una fuente natural, se debe determinar completamente su estructura antes de comenzar su síntesis. Para conseguirlo se necesitan técnicas analíticas que no dañen la muestra (Wade, 2006).

4.12.1 Cromatografía

Ésta técnica se usa para obtener los componentes individuales puros de una mezcla y también para determinar la proporción de éstos componentes. En la cromatografía, las moléculas se distribuyen entre dos fases distintas, y la separación tiene relación directa con la diferencia de solubilidad que algunas moléculas muestran en cada fase. Las separaciones se obtienen al introducir compuestos orgánicos en una fase estacionaria y dejando luego que una fase móvil fluya a través de la mezcla. Cada componente interactúa con la fase estacionaria y se disuelve en la fase móvil en diferente medida. Los compuestos unidos con menos fuerza a la fase estacionaria y más solubles en la fase móvil recorren una distancia mayor que los demás componentes. Los diversos métodos cromatográficos difieren con respecto a la fase móvil (líquido o gas), la fase estacionaria (papel, gel o empaque sólido) y la fuerza que impulsa a la fase móvil (presión, gravedad o un campo eléctrico).

Existen diferentes métodos cromatográficos entre los que podemos encontrar la cromatografía en papel. Este se aplica a productos polares como carbohidratos, aminoácidos, ácidos orgánicos y fenoles, la separación se realiza sobre tiras de papel poroso, participando tanto fenómenos de partición como de adsorción. La cromatografía en capa fina se emplea para la separación de mezclas de toda clase de

productos naturales y las condiciones de separación se eligen en función de las características de la mezcla a separar. También se utiliza la cromatografía en columna que involucra la adsorción de un compuesto a una fase estacionaria y la elución de éste con disolventes de diferente polaridad. Se emplea al igual la cromatografía flash que tiene el mismo principio que la cromatografía en columna aplicando una presión en la parte superior. Entre otras se encuentran también la cromatografía líquida de baja y mediana presión, cromatografía gas – líquido, cromatografía líquida de alta resolución y cromatografía en contra corriente por goteo (Villar del Fresno, 1999).

4.12.2 Espectroscopia infrarroja (IR)

La región infrarroja (del latín, *infra*, “debajo del rojo”) del espectro corresponde a frecuencias que se encuentran justo por debajo del visible, y por encima de las microondas más altas y de las frecuencias de radar entre 8×10^{-5} cm y 1×10^{-2} cm. Los espectrómetros de infrarrojo suelen operar en el medio de esta región, a longitudes de onda entre 2.5×10^{-4} cm y 25×10^{-4} cm, que corresponden a energías que van desde 1.1 hasta 11 kcal/mol (4.6 a 46 kJ/mol). Los fotones de luz infrarroja no tienen suficiente energía para producir transiciones electrónicas, pero pueden hacer que grupos de átomos vibren respecto a los enlaces que los conectan. Igual que en las transiciones electrónicas, estas transiciones vibracionales corresponden a distintas energías y las moléculas absorben radiación infrarroja sólo a ciertas longitudes de onda y frecuencias.

La posición de una banda infrarroja se especifica por su longitud de onda (λ), y se mide en *micras* (μm). Una micra (o *micrómetro*) corresponde a 10^{-6} o 10^{-14} cm; sin

embargo, una unidad más común es el número de onda ($\bar{\nu}$), que corresponde al número de ciclos (longitudes de onda) contenidos en un centímetro. El número de onda es el recíproco de la longitud de onda (en centímetros). Como $1 \text{ cm} = 10\,000 \text{ }\mu\text{m}$, el número de onda se puede calcular dividiendo 10 000 entre la longitud de onda en micras. La unidad del número de ondas es el cm^{-1} (inverso del centímetro). El número de onda (en cm^{-1}) se ha convertido en la forma más frecuente de especificar las absorciones en IR y es proporcional a la frecuencia (ν) de la onda, por lo que también es proporcional a la energía del fotón ($E = h\nu$). Sin embargo, en algunos trabajos a veces se utilizan las micras (Wade, 2006)

Un enlace covalente entre dos átomos funciona como un resorte. Si se estira el enlace, una fuerza de restauración jala entre sí a los dos átomos hacia la longitud del enlace en equilibrio. Si se comprime el enlace, la fuerza de restitución empuja a los dos átomos, apartándolos. Si se estira o se comprime el enlace y después se suelta, los átomos vibran. La frecuencia de la vibración de tensión depende de dos factores: las masas de los átomos y la rigidez del enlace. Los átomos más pesados vibran más lentamente que los más ligeros. En un grupo de enlaces con energías similares de enlace, la frecuencia disminuye cuando aumenta el peso atómico (Wade, 2006).

Los espectros de infrarrojo (IR) contienen muchas absorciones diferentes, y no sólo una absorción por cada enlace. Muchas de esas absorciones se originan en las vibraciones de tensión de la molécula como un todo, o por vibraciones de flexión. En una vibración de flexión, las longitudes de los enlaces permanecen constantes pero los ángulos de enlace vibran con respecto a sus valores de equilibrio. Es poco probable que dos compuestos diferentes (excepto los enantiómeros) tengan las

mismas frecuencias para todas sus vibraciones complejas. Por este motivo, se considera que el espectro infrarrojo da una “huella dactilar” ($600 - 1400 \text{ cm}^{-1}$) de una molécula. Un espectrómetro infrarrojo mide las frecuencias de la luz infrarroja que absorbe un compuesto. El rayo de luz pasa a través de la celda de la muestra. El rayo de referencia pasa a través de una celda de referencia que contiene sólo el disolvente (Wade, 2006).

El aspecto más útil de la espectroscopia infrarroja es su disponibilidad para identificar los grupos funcionales de un compuesto, sin embargo no proporciona información acerca del esqueleto de carbonos de los grupos alquilo en el compuesto. Este aspecto se determina por resonancia magnética nuclear (RMN) (Wade, 2006).

4.12.3 Espectrometría de masas

Para determinar la estructura de un compuesto se necesita un peso molecular, y si es posible, la fórmula molecular. La espectrometría de masas proporciona el peso molecular, así como información valiosa acerca de la fórmula molecular, empleando una cantidad muy pequeña de muestra. La espectrometría de masas de alta resolución puede dar una fórmula molecular exacta, y da información estructural que se puede emplear para confirmar una estructura a la que se llegó a través IR (Wade, 2006).

La espectrometría de masas es diferente de la espectroscopia. En la espectroscopia está implicada la absorción (o emisión) de luz en un intervalo de longitudes de onda. En la espectrometría de masas no se utiliza luz. En el espectrómetro de masas, se hace incidir electrones (u otras partículas) de alta energía sobre la muestra, lo que

hace que se rompan las moléculas; se miden las masas de los fragmentos y esta información se utiliza para reconstruir la molécula.

Durante el bombardeo, el espectrómetro ioniza las moléculas en un alto vacío, separa los iones de acuerdo con sus masas y mide de los diferentes iones según sus masas. El espectro de masas es el gráfico que se obtiene a partir del espectrómetro de masas, representando la relación masa/carga de cada fragmento formado en el eje de las abscisas. Los iones formados en cada fragmentación tienen una carga de +1, por lo que cada pico que se observa en el espectro de masas representa indirectamente la masa del ion. En el eje de las ordenadas se grafica la intensidad de cada pico; ésta refleja la estabilidad de cada fragmento como ion; los iones más estables permanecerán más tiempo en el espectrómetro y darán señales más intensas. La señal más intensa en el espectro (pico padre) representa al ion más estable de la fragmentación. Si un ion formado no es estable, se producirá un pico poco intenso que algunas veces no es detectado por el aparato. De manera general, los alcoholes primarios o secundarios producen picos muy pequeños que no son observados en los espectrómetros de masas de baja resolución, sólo se observan sus fragmentos correspondientes. Debido a que la intensidad del pico en masas corresponde a la estabilidad del ion formado, generalmente el ion molecular es difícil de observar si produce un ion inestable. Para observar al ion molecular se requiere de técnicas especiales de ionización o de detección en espectrómetros de masas de alta resolución, las cuales, dada su alta sensibilidad, producen masas exactas del orden de diezmilésimas, con lo cual es posible asignarle una fórmula molecular (Wade, 2006).

Aunque en la investigación fitoquímica principalmente se utilizan métodos de separación, en la mayoría de los casos, aunque la elucidación estructural aparece

como la parte fundamental de la investigación, también se realiza la evaluación de la actividad citotóxica en células normales de los nuevos compuestos.

4.13 Ensayos de citotoxicidad *in vitro*

La definición de citotoxicidad tiende a variar dependiendo de la naturaleza del estudio, si las células mueren o simplemente tienen su metabolismo alterado. Estos ensayos son empleados porque son baratos, fácilmente cuantificables y reproducibles. Muchos experimentos *in vitro*, tienen el propósito de determinar la potencial citotoxicidad de los compuestos estudiados, porque van a ser usados como fármacos, cosméticos y deben demostrar que no son tóxicos o porque van a ser usados como agentes anticáncer y la citotoxicidad es crucial para su acción (Freshney, 2000).

Según Freshney (2000), los ensayos de citotoxicidad se pueden clasificar en ensayos de viabilidad y ensayos de supervivencia, los primeros se emplean para determinar la proporción de células que inmediatamente después de un tratamiento potencialmente traumático, se mantienen intactas. Mediante estos ensayos se puede evaluar la citotoxicidad de un tratamiento en términos de concentraciones letales (CL).

La concentración letal 50 (CL₅₀) es la concentración de la sustancia en estudio que causa la muerte al 50% de las células presentes, evaluadas inmediatamente después de la sustancia (Cordero, 2000).

Para Freshney (2000), algunos ensayos de citotoxicidad como los de viabilidad que se basan en la capacidad que tienen las células para excluir sustancias a las que son impermeables, ofrecen una interpretación instantánea. Estos ensayos de viabilidad son para medir la tasa de supervivencia directamente, las células que al ser expuestas al colorante no se tiñen, se consideran viables y son de particular importancia para

agentes tóxicos los cuales ejercen sus efectos primarios sobre la integridad de la membrana.

4.13.1 Método del MTT

Muchos ensayos biológicos requieren medir la supervivencia y/o proliferación de las células de mamífero, esto puede lograrse por varios métodos, para esto se desarrolló un ensayo colorimétrico rápido, versátil y cuantitativo, basado en una sal de tetrazolio MTT (metil triazol tetrazolio) o bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio, mide solo células vivientes y puede medirse espectrofotométricamente leyendo la absorbancia entre 540-570 nm (Mosmann, 1983).

El MTT es una sal de tetrazolio color amarillo que se utiliza para medir la actividad y viabilidad celular por el rompimiento causado por la reducción (aceptación de un H^+) del anillo de la sal de tetrazolio MTT por acción de las enzimas deshidrogenasas mitocondriales: succinato-deshidrogenasas, para formar unos cristales azules de formazán insolubles en agua (Fig. 20), pero solubles en dimetil sulfóxido (DMSO). La viabilidad celular es proporcional a la absorbancia que presentan los cristales de formazán en solución (Ángel, 1993).

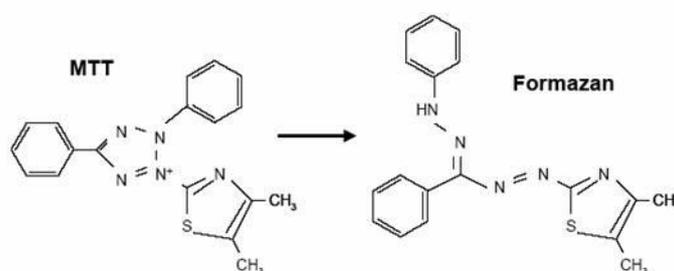


Figura 20. Metabolización de MTT a sales de Formazán por células viables

4.14 Plantas con actividad anti – *Helicobacter pylori*

Existen diversos estudios sobre el uso de plantas medicinales en contra de *H. pylori*, sin embargo, se trata en su mayoría de estudios preliminares, realizados *in vitro*, lo cual resulta comprensible, pues la gran mayoría de los recursos de investigación están volcados en el área de la farmacología. Sin embargo, hay que señalar que aunque este tipo de trabajos es reciente, siendo el primero un artículo publicado en 1991, y su número ha crecido sólo en los últimos años (del 2000 en adelante), es ya muy grande el número de plantas que han comenzado a investigarse y ofrecen un enorme campo de investigación y de posibilidades para el tratamiento de la infección por *H. pylori*.

A nivel mundial se ha estudiado el efecto anti *H. pylori* de alrededor de 327 plantas tanto de uso comestible como medicinal y de las cuales al 60.8% se les ha encontrado un efecto directo sobre esta bacteria. Así lo ilustra un amplio trabajo publicado en el 2007 por Castillo y Romero, investigadores del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la U.N.A.M. Los autores reportan más de 160 plantas para las cuales se han confirmado dicha acción.

En otro artículo que ofrece un excelente panorama sobre el tema que nos ocupa, investigadores del mismo Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la U.N.A.M., comentan que se han reportado, a nivel mundial, una gran variedad de compuestos con actividad anti-*H. pylori in vitro*, en el que se destacan los flavonoides, taninos, cumarinas, terpenos, quinolonas y alcaloides. Sin embargo, sólo a muy pocos de ellos se les ha demostrado que mantienen su actividad *in vivo* (Palacios y col., 2011).

Estos autores destacan otra área de interés que tienen los estudios sobre los compuestos vegetales activos contra *H. pylori*, consiste en el desarrollo de nuevos compuestos químicos a partir de la identificación de sustancias naturales que presenten una excelente actividad anti bacteriana. Dichos compuestos naturales pueden ser modificados para mejorar su eficacia y reducir posibles efectos secundarios. Otra vía, tangencial a esta, resulta de combinar moléculas naturales con moléculas sintéticas ya existentes, obteniendo así un tercer tipo de compuesto muy superior a los precedentes. Los autores de la revisión recién citada, refieren el trabajo del profesor Hai Liang Zhu y sus colaboradores, del Instituto de Biomoléculas Funcionales, de la Universidad de Nanjing, en China, quienes lograron obtener un producto novedoso, 50 veces más activo que el metronidazol contra *H. pylori*, al combinar dicho antibiótico con genisteína, además el nuevo compuesto demostró tener propiedades antiinflamatorias (Zhu, *et al.*, 2007).

En un estudio realizado en la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L., Moreno (2006) reportó la actividad de los extractos metanólicos de *Agave lechuguilla* y *Agave lophantha* sobre *H. pylori* Cepa J 99.

Algunos estudios han demostrado que el orozuz contiene diferentes componentes activos en contra de *H. pylori* y que inclusive es capaz de tener actividad contra cepas de la bacteria que son resistentes a algunos antibióticos. Estos, y algunos otros estudios, ponen en evidencia el hecho de que dicha planta, o bien el desarrollo de algunos compuestos elaborados en base a dicha planta, pueden ofrecer una sólida alternativa ante el incremento de la resistencia a los antibióticos por parte del *H. pylori* (Krausse, *et al.* 2004; Fukai, *et al.*, 2002).

Un interesante trabajo de investigación, también de un aporte de investigadores del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la U.N.A.M., quienes revisaron, *in vitro*, el poder anti-*H. pylori* de 53 plantas usadas en la Medicina Tradicional Mexicana para tratar problemas gastrointestinales (Castillo-Juárez I y col., 2009).

4.15 Agaves

Desde la época prehispánica los agaves han sido usados por los seres humanos y continúan siendo ampliamente utilizados como fuentes de alimento, bebidas, materiales de construcción y medicinas naturales (Arizaga y Escurra, 2002).

El estudio de los agaves es de gran importancia debido a su uso tradicional como medicamento en diferentes culturas como la de la India y México. Los Agaves se utilizan como diuréticos, antisifilítico, laxantes, antiescorbútico y anticancerígenos por lo que lo convierte en una excelente especie para el estudio fitoquímico (Ding, 1992). Sus hojas o pencas son fuente importante de metabolitos secundarios y pueden encontrarse especialmente saponinas, saponinas esteroidales y flavononas.

En el género agave se han identificado varias sapogeninas como: hecogenina, manogenina, yucagenina, agavogenina, sarsasapogenina, texogenina, esmilagenina, gitogenina, tigogenina y clorogenina (Hernández, *et al.*, 2005). En un estudio sobre la composición de *Agave lechuguilla*, encontraron la presencia de esmilagenina y gitogenina con rendimientos de 5 g/kg y 0.6 g/kg en base seca respectivamente. En la lechuguilla se ha reportado la presencia de esmilagenina (sapogenina esteroideal), que es un precursor esteroideal, además de 8 sapogeninas más: yucagenina,

gitogenina, hecogenina, tigogenina, diosgenina, gentrogenina, clorogenina y ruizgenina, por lo que podría emplearse como fuente de esteroides, para la elaboración de cortisona (antiinflamatorio), e incluso estrógeno y progesterona, debido a que sus hojas contienen entre 1 y 2 por ciento del peso seco de saponinas esteroidales (Hernández, *et al.*, 2005).

También se sabe que se usan para producir esteroides, productos para cosmetología, fibras como el henequén, combustible y jabón (Mc Vaugh, 1989; Nobel, 1988; Piven, *et.al.*, 2001). Gentry (1982), afirma que el cultivo de diferentes especies de Agave (maguey) para la producción de pulque se desarrolló con las civilizaciones mesoamericanas. Un desarrollo mucho más reciente, especialmente en los últimos dos siglos, es la producción de licor destilado como el mezcal y el tequila (Mc Vaugh, 1989). Se puede decir con certeza que no existe ningún otro grupo de plantas silvestres de México que haya tenido tantas modalidades de utilización como los magueyes (Gómez-Pompa; 1963).

El género Agave se encuentra ubicado dentro de la familia *Agavaceae*, la cual surgió aproximadamente hace 15 millones de años (Eguiarte, *et al.*; 2000). Esta familia es de distribución americana; tiene su límite septentrional en Dakota del Norte, Estados Unidos y hacia el sur se extiende a través de los Andes hasta Bolivia y Paraguay, incluyendo Centroamérica y las Antillas. El centro de mayor riqueza y biodiversidad para la familia se encuentra en México y áreas circunvecinas (Fig. 21) (García Mendoza 1995).

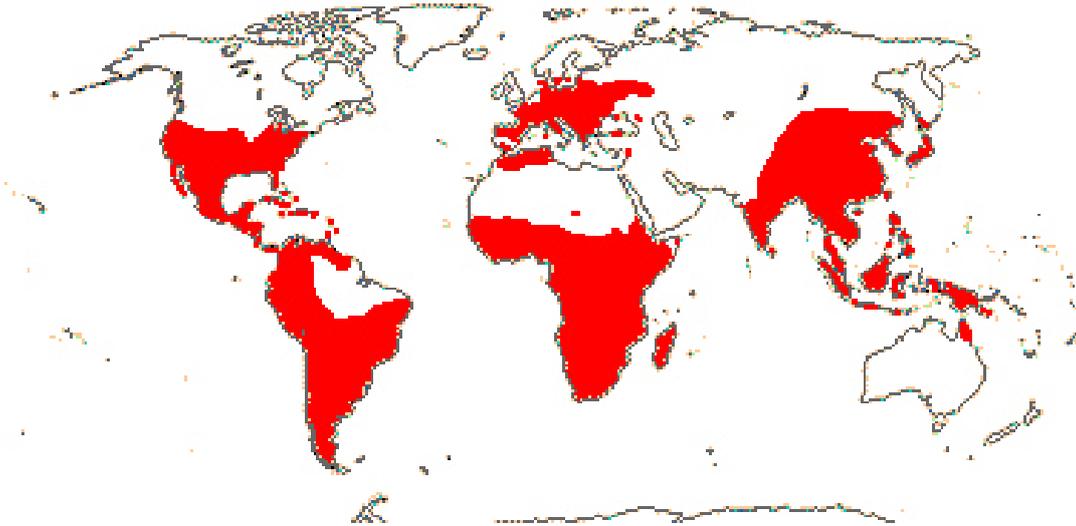


Figura 21. Distribución de la familia *Agavaceae*

Todas las especies de la familia *Agavaceae* son nativas de América y se encuentran clasificadas en ocho géneros, los cuales están presentes en nuestro país; es por ello que Eguiarte *et al.* (2000) mencionan que el centro de origen de esta familia es México central. No existe un acuerdo en cuanto al número de especies, sin embargo, García-Mendoza y Galván (1995) afirman que tiene un total de 228 especies y consideran que un 75% del total se encuentra en el territorio mexicano. De todas las especies que posee el país, 55% son endémicas. Los estados que poseen un mayor número de representantes son Oaxaca, Durango y Puebla, seguidos por Sonora, Jalisco, Coahuila, Chihuahua, San Luis Potosí, Nuevo León y Zacatecas.

Los ocho géneros de la familia presentan biología reproductiva contrastante, ya que algunas especies son iteróparas (policárpicas) y los individuos se pueden reproducir cada año, mientras otras son semélparas (monocárpicas) produciendo solo una inflorescencia espectacular en su vida, para después morir (Eguiarte, *et al.*, 2000).

4.15.1 El género *Agave*

El nombre del género *Agave* proviene del griego que significa “admirable” y fue descrito por Linneo (Gómez-Pompa, 1963). Sus miembros son nativos de Norteamérica, Centroamérica, el Caribe y Sudamérica y se distribuyen en latitudes de 40° N y 6° N (Arizaga y Ecurra, 2002). Dominan vastas áreas, en particular ambientes xerofíticos (Silva-Montellano y Eguiarte, 2003). El género cuenta con 166 especies de las cuales 125 se encuentran en México. Se considera a la Altiplanicie Mexicana como su centro de distribución, reconociendo que las llanuras centrales y la subregión del sur (Puebla y Morelos) es donde se encuentra la mayor riqueza de especies, la cual disminuye considerablemente al sur del Istmo de Tehuantepec, así como hacia Sonora y Baja California (Eguiarte, *et al.*, 2000; García-Mendoza; 1995).

Gentry (1982) divide el género en dos subgéneros: *Littaea* y *Agave*. El subgénero *Agave* está formado aproximadamente por 102 especies; en México tiene una distribución más amplia que *Littaea*, desde las dunas costeras a nivel del mar hasta los bosques de *Pinus-Quercus* a los 2600 – 2900 metros de altitud, y coloniza un mayor número de ambientes, aunque la variedad de formas que presenta es reducida. La mayoría de las 53 especies de *Littaea* crece en altitudes superiores a los 1000 metros aunque también se desarrollan al nivel del mar y hasta los 2500 metros, tanto en bosques de *Pinus-Quercus* como en selvas bajas caducifolias (García-Mendoza; 1995). El subgénero *Littaea* está caracterizado por sus inflorescencias de apariencia espigada y el subgénero *Agave* posee inflorescencias paniculadas y flores en grandes agregados umbelados sobre pedúnculos laterales (Eguiarte, *et al.* 2000; García-Mendoza, 1995).

Dentro de las características principales del género *Agave* destacan las siguientes: son plantas perennes, suculentas, monocotiledóneas, con raíces duras fibrosas y tallos gruesos muy cortos. Las hojas son generalmente verdes, sin embargo, también pueden ser blancas o grisáceas. La superficie puede ser muy áspera al tacto o muy suave, la mayoría son largas, gruesas hacia la base y están arregladas en rosetas basales con espinas laterales y en las puntas. La espina terminal puede ser corta o muy larga, acanalada totalmente o en partes con sección transversal, redondeada y aplanada. El color de las espinas puede ser blanco grisáceo o moreno rojizo.

Las flores de varios tamaños y colores en las distintas especies, pueden ser desde unos tres centímetros hasta 15 o 20 cm de largo. Son principalmente protándricas, hermafroditas, auto-compatibles con poca auto-fertilización, actinomorfas, tienen seis tépalos erectos o curvados, imbricados, a veces desiguales. Presentan seis estambres, filamentos insertados en el tubo o en las bases, el tubo del perianto corto, ovario trilobular, pistilo alargado, estigma trilobular y semillas negras aplanadas. El fruto es una cápsula leñosa con muy diversas formas y tamaños, dehiscente con tres alas (Arizaga, 1998; Arizaga y Ecurra, 1995, Eguiarte, *et al.*, 2000; Gómez-Pompa, 1963; Mc Vaugh, 1989; Slauson, 2000).

Las plantas de este género presentan varias adaptaciones a medio; tienen la capacidad de acumular agua en las gruesas hojas suculentas lo que permite que estén especialmente adaptadas a la aridez. Por otra parte, estas plantas pueden propagarse por dos mecanismos: La producción de semillas a través de la reproducción sexual de las rosetas semélparas y la multiplicación vegetativa, o clonación (Arizaga y Ecurra, 1995).

Cuando comienza la floración, los agaves desarrollan una gran inflorescencia terminal o tallo que florece (conocido botánicamente como escapo y llamado quiote en México), como resultado de un rápido alargamiento del meristemo apical después de años de crecimiento vegetativo de la roseta basal (Arizaga, *et al.*, 2000). Una característica interesantes de la inflorescencia es la presencia de brácteas a veces grandes que se van haciendo pequeñas hacia el extremo de la misma (Gómez-Pompa, 1963).

4.16 Descripción de plantas estudiadas

4.16.1 *Agave lechuguilla*

Clasificación Botánica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Subclase: Liliidae

Orden: Liliales

Familia: Agavaceae

Género: *Agave*

Especie: *lechuguilla*



Figura 22. *Agave lechuguilla*

Descripción Botánica:

Agave lechuguilla es un arbusto rosetófilo, pequeño, con 20-50 hojas. Las hojas maduras son de forma lineal a lanceolada, de color verde-amarillo, de ascendentes a erectas, algunas veces en el haz presentan una franja longitudinal de un color verde más claro; sus espinas marginales son detlejas y tienen una espina apical. La inflorescencia es un espiga de 2.5-3.5 m de alto.

Distribución Geográfica:

La especie es abundante desde el sureste de Arizona, y el sur de Nuevo México y Texas, hasta los estados de México e Hidalgo, e incluso Puebla. *Agave lechuguilla* es dominante fisonómico del matorral desértico rosetófilo, pero también puede registrarse en el matorral desértico micrófilo y en los ecotonos entre ambos tipos de matorral.

4.16.2 *Agave lophantha*

Clasificación Botánica

Reino Plantae

División: Spermatophyta

Clase: Angiospermae

Subclase: Monocotiledoneae

Orden: Asparagales

Familia: Agavaceae

Subfamilia: Agavoideae

Tribu: Agaveae

Género: *Agave*

Especie: *lophantha*



Figura 23. *Agave lophantha*

Descripción Botánica:

Planta pequeña radiada, rosetas simples o surculosas de 30-60 por 50-100 cm. Las plantas maduras son en ocasiones con tallos visibles hojas numerosas de 30-70 por 3-5 cm., espatulazas de color verde brillante a verde amarillentas con o sin una línea media pálida, lineal o lanceolada, es delgada, flexible algo gruesa hacia la base y redondeada abajo, plana a cóncava arriba con márgenes córneos, ondulados a crenados, los dientes simples u ocasionalmente dobles sobre anchas y cortas mamilas, rectos o ligeramente encorvados, delgados, la mayoría de 4-8mm de largo y 1-2cm de distancia entre ellos, las espinas son pequeñas de 1-2cm de largo tubuladas de color café oscuro a gris, aplanadas cerca de la base.

Distribución Geográfica:

La distribución natural del *Agave lophantha* es desde el sureste de Texas hasta el sur de México por todo lo largo de la costa hasta el centro de Veracruz. Es muy frecuente que se encuentre sobre rocas calizas, así como en los precipicios y los afloramientos rocosos en los cuales los bosques tropicales no son muy densos y pueden proporcionar la luz del sol adecuada para el crecimiento de esta planta, se encuentra en elevaciones de 30-1,500 metros de altitud.

4.16.3 *Agave victoriae reginae*

Clasificación Botánica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Subclase: Liliidae

Orden: Asparagales

Familia: Agavaceae

Género: *Agave*

Especie: *A. victoriae reginae*



Figura 24. *Agave victoriae reginae*

Descripción Botánica:

Agave victoriae reginae es un agave en forma de roseta con hojas duras, marcadas por franjas blancas y terminadas en una aguda espina. Su tamaño llega a alcanzar hasta los 60 cm de diámetro, es de muy lento crecimiento, con muy bajos requerimientos de agua. Algunos conocedores llegan a decir que se necesitan más de 40 años para llegar a florecer. Su floración es mediante un vástago de aproximadamente 5 m de alto.

Distribución Geográfica:

Se le puede encontrar en pocos hábitat existentes en México, 3 cuando mucho, localizados en el estado de Nuevo León al noreste de México.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Material biológico

Agave lechuguilla

Agave lophantha

Agave victoria reginae

Helicobacter pylori Cepa J 99

5.2 Colecta e identificación del material vegetal

Agave lechuguilla se colectó en la Ciudad de Saltillo, Coahuila; *Agave lophantha* y *Agave victoria reginae* fueron colectados en el municipio de Ciénega de Flores, Nuevo León. Los ejemplares fueron identificados por la Dra. María del Consuelo González de la Rosa y un espécimen de cada planta fue depositado en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. para su número de registro.

5.3 Obtención de los extractos metanólicos

Las hojas del material vegetal se limpiaron cuidadosamente para eliminar la tierra y partículas extrañas que pudieran presentar, se cortaron en trozos pequeños de aproximadamente 1 cm y posteriormente se colocaron en un horno seco Felisa® modelo FE-295V a 40° C durante 72 h para eliminar la mayor humedad posible. Una vez secos, se trituraron por separado en un molino manual (Victoria®) y almacenados en un recipiente seco.

Para la obtención de los extractos, se pesaron 60 g de cada muestra vegetal, se depositaron por separado en un matraz ErlenMeyer de 500 mL y se homogenizaron con 250 mL de metanol (CTR Scientific, México), se sellaron herméticamente para evitar evaporación del solvente durante la extracción y se dejaron en agitación constante durante 72 h en un Agitador Dual Action (Shaker Lab-Line). Una vez transcurrido este período, se procedió a realizar la filtración utilizando papel filtro Whatman N° 1. Este procedimiento se repitió 3 veces.

Los extractos metanólicos se concentraron en un rotavapor a presión reducida y a una temperatura de 45°C (Yamato modelo RE 200), se llevaron a sequedad total a temperatura ambiente y una vez recuperados los extractos, se pesaron para determinar su rendimiento. Posteriormente se envasaron en viales de vidrio color ámbar y refrigerados a 4°C hasta su uso.

5.4 Pruebas químicas para la determinación de grupos funcionales

Para la determinación parcial de los diferentes tipos de metabolitos secundarios presentes en los extractos se realizaron las pruebas químicas de identificación. Los extractos crudos se prepararon a 50 mg/mL disueltos en metanol. Se utilizaron placas de cerámica de 12 pozos (Domínguez, 1979).

5.4.1 Prueba del KMnO_4

Para insaturaciones. Se disolvieron de 1-2 mg de los extractos en 1 mL de agua, acetona o metanol y se le agregó gota a gota una solución de KMnO_4 al 2% en agua. La prueba se consideró positiva si se observó decoloración o formación de precipitado café, resultado de la formación de dióxido de magnesio (Domínguez, 1979).

5.4.2 Prueba de la 2-4 Dinitrofenilhidracina

Para grupo carbonilo. Una muestra de 1 a 10 mg del extracto se disolvió en etanol, se le añadió una solución saturada de 2-4 dinitrofenilhidracina en HCl 6N, la formación de un precipitado amarillo o naranja indicó la presencia del grupo carbonilo (Domínguez, 1979).

5.4.3 Prueba del FeCl₃

Para oxhidrilos fenólicos (taninos vegetales). Se disolvieron 1-2 mg del extracto en 1 mL de agua o etanol y después se le agregaron unas gotas de cloruro de fierro al 12.5% en agua. La aparición de un precipitado rojo, azul-violeta o verde fue considerado positivo (Domínguez, 1979).

5.4.4 Prueba de Liebermann-Burchard

Para esteroides y metilesteroides. Se mezcló 1 mL de anhídrido acético con 1 mL de cloroformo, se dejó enfriar la mezcla y se le añadió una gota de ácido sulfúrico. Este reactivo se pone en contacto con una gota de solución del extracto y una gota de cloroformo. La aparición de cualquier color determinó que la prueba fue positiva (Domínguez, 1979).

5.4.5 Prueba de Molish

Para carbohidratos. En un tubo de ensaye se mezcló 1 -2 mg del extracto con 1-2 gotas del reactivo de Molish (solución al 5% de α - naftol en etanol) y se deslizaron por la pared del tubo inclinado 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. Si se formó un anillo color violeta la prueba fue positiva (Domínguez, 1979).

5.4.6 Prueba de las coumarinas

Se disolvió 1-2 mg del extracto, se le agregó gota a gota el reactivo NaOH al 10 %, si apareció una coloración amarilla que desapareció al acidular, la prueba fue positiva.

5.4.7 Prueba de lactonas

Se disolvió de 1-2 mg del extracto se le agregó una solución alcohólica de NaOH al 10 %. Un color amarillo o anaranjado que se perdió o desapareció al agregar unas gotas de HCl indicó la presencia de un anillo lactónico (Domínguez, 1979).

5.4.8 Prueba de Baljet

Para sesquiterpenlactonas. Se utilizaron dos soluciones que se mezclaron en volúmenes iguales antes de usarse. Solución A: 1 g de ácido pícrico en 100 mL de etanol; Solución B: 10 g de hidróxido de sodio en 100 mL de agua. Para la prueba se colocaron 2 -3 mg del extracto y unas 3-4 gotas del reactivo (mezcla), se consideró positiva si se formó una coloración anaranjada o roja oscura (Domínguez, 1979).

5.4.9 Prueba de Shinoda

Para flavonoides. Se disolvió 1 mg del extracto en etanol y unas limaduras de magnesio, se aplicó calor (60° C) y posteriormente se agregaron unas gotas de HCl concentrado. La prueba se consideró positiva si aparecieron colores naranja, rojo, rosa y azul-violeta.

5.4.10 Prueba de Dragendorff

Para alcaloides. Se usó la modificación de Munier y Machelobuf para la determinación de alcaloides. Para ello se prepararon dos soluciones, la solución A con 0.85 g de nitrato de bismuto, los cuales se mezclaron con 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua y solución B con 8 g de yoduro de potasio disuelto en 20 mL de agua. El reactivo se preparó mezclando 5 mL de la solución A, 4 mL de la solución B y 100 mL de agua. Se disolvieron 1-2 mg del extracto en etanol, se colocaron unas gotas en una placa de porcelana y se añadieron unas gotas del reactivo. La prueba fue positiva si se presentaron coloraciones rojo o naranja, persistentes por 24 h.

5.4.11 Saponinas

5.4.11.1 Prueba de la agitación

Una porción del extracto se disolvió en 1 mL de agua en un tubo de ensayo de 75 X 12 mm y se agitó vigorosamente durante 3-5 minutos. La formación de espuma con apariencia de panal de abeja estable por 30 minutos, se consideró prueba positiva. (Molina-Salinas, 2001).

5.4.11.2 Prueba del bicarbonato de sodio

La sal se preparó al 10 % en agua. Se disolvieron de 1-2 mg del extracto disuelto en agua o etanol y se agregaron de 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Se agitó ligeramente, luego se agregaron 2-3 gotas de la solución de bicarbonato de sodio. La aparición de burbujas y su permanencia por más de 1 min indicaron la presencia de saponinas (Domínguez, 1979).

5.5 Pruebas de evaluación antibacteriana de los extractos metanólicos sobre *H. pylori*

5.5.1 Activación de la cepa

H. pylori J 99 fue proporcionada por Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., la cual se encontraba conservada en viales de plástico conteniendo caldo nutritivo con glicerol al 15% en congelador a -70° C y se utilizó como control de los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana.

Para su cultivo se tomó la bacteria de los viales con una pipeta Pasteur, se sembró en placas de agar sangre y se incubó a 37° C en una atmósfera de CO₂ por 72 h.

Los cultivos fueron identificados como *H. pylori* basados en la morfología de las colonias, que son de aspecto pequeño y traslúcidas; reacción química como ureasa positiva y observándose una morfología de bacilo curvado Gram negativo con la tinción de Gram.

Se llevaron a cabo varias resiembras y para conservar la bacteria se necesitó una placa con abundante crecimiento, se recogió con un hisopo y se depositó en viales conteniendo 1 mL de caldo nutritivo con glicerol al 15% y congelados a -70° C para investigaciones posteriores.

5.5.2 Preparación de los extractos

Para obtener una solución stock, se pesaron 40 mg de cada uno de los extractos y se disolvieron en 5 mL de DMSO. Se colocaron en Vórtex para disolver completamente (homogenizar). Se dejaron reposar durante 2 h para su esterilización.

5.5.3 Preparación del antibiótico

Se utilizó cefotaxima 50 mg/mL. Se pesaron 0.05g del antibiótico y se disolvieron en 1 mL de agua destilada estéril. Posteriormente se esterilizó por filtración utilizando membranas milipore de 0.22 μm .

5.5.4 Preparación del inóculo

El inóculo se preparó a partir de un cultivo de 48 h. Se seleccionaron de 3 a 5 colonias aisladas, se recogieron con un hisopo de algodón y se transfirieron a un tubo con solución salina estéril. Posteriormente se ajustó la turbidez a 0.5 del estándar de McFarland (1.5×10^8 UFC/mL). De la suspensión del inóculo estandarizada, se transfirieron 10 μL en 11 mL de caldo Mueller Hinton, con TES/sangre lisada de caballo.

5.5.5 Pruebas de evaluación antibacteriana

5.5.5.1 Dilución en agar

Para este ensayo se utilizó la técnica de difusión en placas de agar utilizando placas de 24 pozos. Se utilizó medio de cultivo agar sangre. Para la concentración de los extractos, primeramente se preparó una solución stock pesando 200 mg de extracto y se disolvieron en 100 μL de DMSO. De esta solución se preparó una solución de trabajo para el bioensayo tomando 0.02 mL (20 μL) y se aforó a 2 mL con medio de cultivo (1.980 mL).

La hilera A de la placa corresponde al extracto de *A. lechuguilla*. En el pozo 1 A, se colocaron 5 μL de la solución stock y 995 μL de medio de cultivo; en el pozo 2 A, se colocaron 2.5 μL de extracto y 997.5 μL de agar sangre; en el pozo 3 A, se colocaron 1.25 μL de extracto y 998.75 μL de medio; en el pozo 4 A, se colocaron 0.625 μL de extracto y 999.375 μL de medio y en el pozo 5 A, se colocaron 0.3125 μL de extracto y 999.6875 μL de medio. Las concentraciones obtenidas fueron de 10, 5, 2.5, 1.25 y 0.625 mg/mL.

El mismo procedimiento se llevó a cabo en las hileras B y C que corresponden a los extractos de *A. lophanta* y *A. victoria reginae* respectivamente. Posteriormente en cada uno de los pozos se añadieron 100 μL de la suspensión bacteriana estandarizada a 0.5 de la escala de Mc Farland. Finalmente en la hilera D se colocó antibiótico como control a las concentraciones de 64, 32, 16, 8 y 4 mg/mL.

5.6. Separación de compuestos de extractos metanólicos activos

5.6.1 *A. lechuguilla*

Para la extracción de saponinas se colocaron en un Matraz Erlen Meyer de 500 mL 15 g de extracto metanólico de *A. lechuguilla* con 250 mL de acetona, se filtró y se obtuvieron 7 g de un polvo de color café-verdoso oscuro, los cuáles se colocaron en un vaso de precipitado y fueron desengrasados con 200 mL de hexano, se filtró y se eliminó la fase hexánica obteniéndose un sólido que se purificó con 150 mL de cloroformo, se realizó nuevamente una filtración y el filtrado se solubilizó en 200 ml de etanol, los cuales se concentraron en acetona y se obtuvieron 2.24 g de un material de color pardo oscuro insoluble en acetona, que es el crudo de saponinas del extracto metanólico de *A. lechuguilla*.

5.6.1.1 Pruebas para Saponinas

➤ Prueba de Espuma

Se realizó con material vegetal, con el crudo de saponinas obtenido, un control de saponinas y con agua destilada. En un tubo de ensaye se colocaron 100 mg de material vegetal seco y pulverizado, en un segundo tubo se colocaron 2 ml del crudo de saponinas, en un tercer tubo 2 ml de control de saponinas y en un cuarto tubo 2 ml de agua destilada.

A cada uno de los cuatro tubos se agregaron 10 ml de agua destilada, se colocaron en un vaso de precipitado y se calentaron en una plancha eléctrica a 60° C durante 30 minutos.

Transcurridos los 30 minutos se dejaron enfriar y cada tubo se agitó vigorosamente.

La formación de una capa de espuma, que permaneció estable por 30 minutos, se tomó como prueba positiva para la presencia de saponinas.

➤ Prueba de hemólisis

Esta prueba se realizó en cajas de Petri con agar sangre por triplicado, en cada una de ellas se hicieron cuatro pocillos en los cuales se colocaron 20 µL de extracto metanólico de *A. lechuguilla*, 20 µL del crudo de saponinas, 20 µL de un estándar de saponinas y 20 µL de agua destilada respectivamente. Se incubaron por 24 h a 37°C. La presencia de hemólisis indicó que la prueba es positiva.

➤ **Prueba de la Antrona (Carbohidratos)**

En un tubo de ensaye se colocaron 3 mg del crudo de saponinas del extracto metanólico de *A. lechuguilla* y 1 mL de agua destilada. Posteriormente se dejaron caer a través de las paredes del tubo unas gotas de solución reciente (no más de 24 horas) de antrona al 0.01 % en H₂SO₄ concentrado. La presencia de un anillo de color azul-verdoso o azul en la interfase indicó que la prueba fue positiva para la presencia de saponinas (Domínguez, 1979).

➤ **Cromatografía en Capa Fina**

Se utilizaron placas de Sílica gel 60, en las cuales se colocaron con un capilar dos muestras de un control 1 y un control 2 de saponinas; y una tercera muestra del crudo de saponinas obtenido, aplicándolas aproximadamente a 1 cm de la parte inferior de la placa. Para concentrar las muestras, se realizan varias aplicaciones sobre el origen, dejando secar entre cada una de estas aplicaciones. Se colocaron las placas dentro de una cuba cromatográfica utilizando un sistema butanol-acético-agua 7:15:1.5 para su corrimiento y se revelaron inicialmente bajo luz ultravioleta (UV) y posteriormente por aspersion del reactivo cloruro de cobalto.

En las placas se observaron manchas del crudo de saponinas a la misma distancia de los controles de saponinas.

5.6.2 *A. lophanta*

5.6.2.1 Cromatografía en columna

Para la obtención de saponinas del extracto metanólico de *A. lophanta*, primeramente se colocaron en un vaso de precipitado 5.060 g y se desengrasaron en hexano a ebullición en repetidas ocasiones, utilizando aproximadamente 20 mL de hexano en cada una de ellas. Se decantó quedando 4.860 g de extracto metanólico desengrasado con hexano en el vaso de precipitado y aproximadamente 140 mL de extracto metanólico soluble en hexano, los cuales se concentraron en un rotavapor tipo Büchi a una temperatura menor a 60° C, se llevaron a sequedad total a temperatura ambiente obteniéndose 200 mg de extracto metanólico soluble en hexano.

Posteriormente, se llevó a cabo una separación por cromatografía en columna del extracto metanólico insoluble en hexano, para lo cual se disolvieron los 4.86 g en 11 g de sílica gel y se dejó secar. Se empacó una columna con 64 g de Sílica Gel 60 (0.2 – 0.5 mm) MERCK utilizando mezclas de disolventes de polaridad creciente (Cloroformo, Cloroformo-Metanol y Metanol). Se realizaron cromatografías en capa fina y se seleccionaron las fracciones semejantes.

5.6.2.2 Extracción de Saponinas de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna.

Se combinaron las fracciones semejantes 23 a la 28 obtenidas por la mezcla de elución Cloroformo-Metanol 6:4 obtenidas por cromatografía en columna para realizar la extracción de saponinas.

Se colocaron en un vaso de precipitado y se dejaron secar. Posteriormente se hizo un lavado con acetona en frío y en caliente, se filtró y se obtuvieron 1.250 g de un insoluble en acetona que fue un precipitado de color café claro, soluble en agua o en

metanol caliente, que es el crudo de saponinas del extracto metanólico de *A. lophanta*. Con este crudo se realizaron las pruebas para la identificación de saponinas descritas en la sección 6.6.1.1.

5.7 Evaluación de la actividad de las saponinas obtenidas de los extractos metanólicos de *A. lechuguilla* y *A. lophanta* contra *H. pylori*

Se prepararon soluciones stock de saponinas de *A. lechuguilla* y *A. lophanta* de 10 mg/mL, a partir de estas se hicieron diluciones para obtener concentraciones de 5, 1, 0.5 y 0.25 mg/mL. Los bioensayos se realizaron mediante la técnica de difusión en agar, que consistió en impregnar discos estériles de papel de filtro Whatman N° 3 de 7 mm de diámetro con 20 µL de cada una de las diferentes concentraciones a analizar y utilizando antibiótico como blanco positivo. Estos discos se colocaron en placas de agar sangre/Mueller-Hinton, inoculadas con una suspensión bacteriana de concentración conocida (1.5×10^8 UFC) preparada por comparación con un patrón McFarland 0.5. Seguidamente las placas se incubaron a 37°C durante 48 h en atmósfera de CO₂ para permitir el crecimiento bacteriano y determinar mediante la medida directa de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco.

5.8 Evaluación de citotoxicidad de saponinas

5.8.1 Técnica de azul tripano con células sanguíneas mononucleares

Se utilizó el método de exclusión por azul de tripano (Repetto y Camean 1995) para la cual las células mononucleares fueron aisladas a partir de una muestra clínica de 8 ml de sangre, a la cual fueron agregados 16 ml de Histopaque® (Sigma), se

centrifugó a 1700 rpm a 20° C por 30 min en una centrífuga marca Eppendorf, modelo 5804 R, se toma la capa que corresponde a las células mononucleares (mastocitos y linfocitos), se realizan lavados con 5 ml de PBS a 1600 rpm por 10 min.

Estas células aisladas son analizadas para determinar su viabilidad mediante el analizador Vi-Cell® (Beckton Coulter, Estados Unidos), esperando que cuente con una viabilidad mayor al 90%. Las células se depositaron en una placa de 12 pozos, se incuban por 24 h a 37°C con 5% de CO₂ para la adherencia de los mastocitos, después se toma el sobrenadante que corresponde a los linfocitos en otra placa de 12 pozos. Se coloca la que resultó con mayor actividad, y sustancias como controles en este caso se utilizó DMSO (CTR Scientific) y una muestra blanco. Se exponen por 5 d a 37°C y 5% de CO₂ y se añade azul tripano al 0.4% (marca Gibco) para analizarse mediante el Vi-Cell ® y valorar la cantidad de células que fueron afectadas.

5.8.2 Viabilidad celular, Técnica MTT

Para comprobar la viabilidad celular, se colocaron 5,000 células/pozo en un volumen de 100 µL de medio DMEM/F-12 en microplacas de 96 pozos (Corning Inc. Costar®), posteriormente se incubaron por 24 h a 37 °C en atmósfera húmeda y 5 % de CO₂ en incubadora de cultivo (Lab-line Mod 485). Después de la incubación, el medio de cultivo fue eliminado, y la saponina diluida en el mismo medio fue agregada en concentraciones que van desde 0.065 a 260 mg/mL. Las placas se incubaron durante 5 h a 37° C y la atmósfera de 5 % de CO₂. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y las células se lavaron dos veces con medio de DMEMF-12. La Viabilidad celular se determinó por el método MTT (sal de tetrazolio

(bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio, Sigma®-Aldrich, St Louis, USA). La cuantificación se obtuvo mediante la lectura de la absorbancia en una longitud de onda de 570 nm y la viabilidad celular fue expresada como porcentaje. Y corroborada por Vi-cell, Analizador de viabilidad celular (Beckton Coulter, Estados Unidos, según las recomendaciones del fabricante). Los resultados fueron dados como la media \pm SD de tres experimentos independientes.

5.9 Identificación de la saponina por métodos espectroscópicos

Esto se llevó a cabo en el Laboratorio de Proteómica, Departamento de Genética, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección del Dr. Víctor Torres de la Cruz. La prueba de espuma así como reacciones fitoquímicas fueron utilizadas, para identificar la saponina (Cannell, 1998), y su estructura fue confirmada mediante un instrumento Nano UPLC- MS quadupolo-time of flight modelo Waters, nano Acquity y un MS Mod QTOF premier, Software MassLynx vers 4.1, para este objetivo 10 mg de la muestra fueron disueltos en 10 mL de agua con 0.1% de ácido fórmico e inyectado directamente en una interfaz electrospray operada en modo positivo, este instrumento se continuó calibrando utilizando Glucofibrinopeptido $mz+2$ 785.8426 usando el LockSpray y también se utilizó para calibrar el instrumento en una amplia gama m/z 100 a 1900. Realizando dos experimentos, uno del aparato MS y un segundo con 40 eVolts en la celda de colisión para una fragmentación de los espectros, cada uno tenía 5 minutos de duración.

Todos los datos fueron obtenidos, usando MassLynx vers 4.1, la aplicación de BioLynx y la opción carboTools. El espectro se centró para obtener la corrección de lockspray con la mayor exactitud.

Como información complementaria se realizó un espectro Infrarrojo en un FT - IR (Thermo Electron Corporation. Experimentos Nicolet 380).

6. RESULTADOS

6.1 Colecta e identificación del material vegetal

Los ejemplares secos y montados fueron entregados al Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL para su depósito e identificación.

6.2 Obtención de los extractos metanólicos

Se obtuvieron tres extractos metanólicos a partir de las hojas de las plantas estudiadas. En la Tabla I se observa que el extracto de mayor rendimiento fue el *A. lechuguilla* con un 17.46% seguido por *A. lophantha* con 16.92% y el extracto de menor rendimiento fue el de *A. victoria reginae* con un 11.14%.

Tabla I. Rendimiento de los extractos metanólicos obtenidos

Planta	Parte utilizada	Rendimiento (%)
<i>A. lechuguilla</i>	Hojas	17.46
<i>A. lophantha</i>	Hojas	16.92
<i>A. victoria reginae</i>	Hojas	11.14

6.3 Pruebas químicas para la determinación de grupos funcionales

Se realizaron pruebas coloridas para la determinación parcial de grupos funcionales y metabolitos secundarios presentes en los extractos metanólicos obtenidos. Los resultados de estas pruebas químicas (Tabla II) mostraron la presencia de insaturaciones, carbohidratos, alcaloides y saponinas en los tres extractos.

Tabla II. Grupos funcionales y metabolitos secundarios presentes en los extractos metanólicos obtenidos

Pruebas Químicas	<i>A. lechuguilla</i>	<i>A. lophantha</i>	<i>A. v. reginae</i>
Insaturaciones	+	+	+
Grupo carbonilo	-	-	-
Oxidrilos fenólicos	-	-	-
Esteroides y triterpenos	-	-	-
Carbohidratos	+	+	+
Cumarinas	-	-	-
Lactonas	-	-	-
Sesquiterpenlactonas	-	-	-
Flavonoides	-	-	-
Alcaloides	+	+	+
Saponinas	+	+	+

Para confirmar la presencia de saponinas en los extractos se realizó la prueba de la agitación y de bicarbonato de sodio, mediante la cual se indicó la presencia de saponinas por la formación de espuma.

6.4 Pruebas de evaluación antibacteriana de los extractos metanólicos sobre *H. pylori*

6.4.1 Dilución en agar

Este ensayo se llevó a cabo mediante la técnica de difusión en agar utilizando placas de 24 pozos. Las concentraciones de los extractos utilizadas en esta técnica fueron de 10, 5, 2.5, 1.25 y 0.625 mg/mL y las concentraciones de antibiótico fueron de 64, 32, 16, 8 y 4 mg/mL.

La actividad de los extractos se muestra en la Tabla III, observándose que el extracto de *A. lechuguilla* presentó actividad frente a *H. pylori* a las concentraciones de 10 y 5 mg/mL, mientras que el extracto de *A. lophantha* presentó actividad solamente a la concentración de 10 mg/mL. El extracto de *A. victoria reginae* no mostró actividad a ninguna concentración.

Tabla III. Actividad antibacteriana de los extractos metanólicos frente a *H. pylori*

Extracto	Concentraciones mg/mL					Medio + Inóculo
	10	5	2.5	1.25	0.625	
<i>A. lechuguilla</i>	+	+	-	-	-	-
<i>A. lophantha</i>	+	-	-	-	-	-
<i>A. victoria reginae</i>	-	-	-	-	-	-
	64	32	16	8	4	
Control positivo	+	+	+	+	+	-

De acuerdo a estos resultados, se dejó de utilizar *A. victoria reginae* y se procedió a separar compuestos que fueran los responsables de la actividad contra *H. pylori* de los extractos de *A. lechuguilla* y *A. lophantha*.

6.5 Separación de compuestos de extractos activos

6.5.1 *A. lechuguilla*

Mediante este método se obtuvieron 2.24 g de un material de color pardo oscuro insoluble en acetona que correspondió al crudo de saponinas del extracto metanólico de *A. lechuguilla* y para identificarlas se siguieron los métodos que a continuación se describen.

6.5.1.1 Pruebas para identificar Saponinas

➤ Prueba de Espuma.

Los resultados de esta prueba se muestran en la figura 25. La prueba fue positiva para la presencia de saponinas por la formación de una capa de espuma que permaneció estable por 30 minutos.



Figura 25. Formación de espuma del crudo de saponinas de *A. lechuguilla*

➤ Prueba de hemólisis.

Esta prueba se realizó con el crudo de saponinas obtenido de *A. lechuguilla* (1), un estándar de saponinas (2) y agua destilada. En la figura 26 se puede apreciar la hemólisis producida por las saponinas, en comparación con el control.

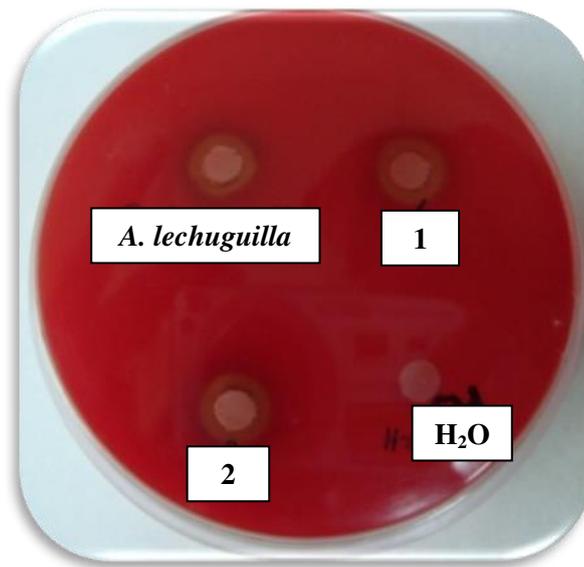


Figura 26. Hemólisis producida por el crudo de saponinas de *A. lechuguilla* (1)

➤ **Prueba de la Antrona (Carbohidratos)**

La presencia de glucósidos en las saponinas obtenidas del extracto metanólico de *A. lechuguilla* se confirmó por la aparición de un anillo en la interfase de color azul-verdoso o azul (Fig. 27).

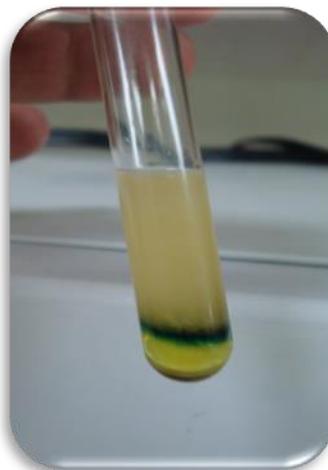


Figura 27. Anillo color azul-verdoso producido por los glucósidos presentes en las saponinas de *A. lechuguilla*

➤ Cromatografía en Capa Fina.

Se utilizaron dos controles de saponinas y una muestra del crudo de saponinas obtenido. Se observaron manchas del crudo de saponinas de *A. lechuguilla* obtenido a la misma distancia de los controles de saponinas (Fig. 28).



Figura 28. Bandas observadas en cromatografía en capa fina del crudo de saponinas de *A. lechuguilla* a la misma distancia de los controles de saponinas

6.5.2 *A. lophantha*

6.5.2.1 Cromatografía en columna

Este método se llevó a cabo por desengrasado del extracto metanólico de *A. lophantha*. y se obtuvieron 4.860 g de material insoluble en hexano. Mediante separación por cromatografía en columna del extracto insoluble en hexano (Fig. 29) se obtuvieron 43 fracciones, cada una de las cuales se redujo a un volumen de 2-3 mL. Se realizaron cromatografías en capa fina (Fig. 30) y se seleccionaron las fracciones semejantes. En la Tabla IV se muestra el sistema de eluentes utilizados.

Tabla IV. Eluentes utilizados en cromatografía en columna del extracto metanólico de *A. lophantha*

Eluentes	Relación	Fracciones
Cloroformo	1	5
Cloroformo : Metanol	9 : 1	3
Cloroformo : Metanol	8 : 2	3
Cloroformo : Metanol	7 : 3	10
Cloroformo : Metanol	6 : 4	10
Cloroformo : Metanol	1 : 1	4
Cloroformo : Metanol	3 : 7	4
Metanol	1	4
Total de fracciones		43



Figura 29. Cromatografía en columna del extracto insoluble en hexano de *A. lophantha*



Figura 30. Cromatografía en capa fina de gel de sílice de las fracciones del extracto insoluble en hexano de *A. lophantha*

6.5.2.2 Extracción de saponinas de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna

Mediante este método se obtuvieron 1.250 g de un insoluble en acetona que fue un precipitado de color café claro, soluble en agua o en metanol caliente, que correspondió al crudo de saponinas del extracto metanólico de *A. lophanta*. Las pruebas de espuma, hemólisis, antrona y cromatografía en capa fina realizadas fueron positivas para la identificación de saponinas en el crudo del extracto metanólico de *A. lophanta* obtenido (Tabla VI).

Tabla V. Pruebas realizadas para la identificación de saponinas en el crudo del extracto metanólico de *A. lophantha*

	Espuma	Hemólisis	Antrona	CCF
Crudo de saponinas	+	+	+	+

6.6 Evaluación de la actividad de las saponinas obtenidas de los extractos metanólicos de *A. lechuguilla* y *A. lophanta* contra *H. pylori*

Este bioensayo se realizó mediante la técnica de difusión en agar utilizando discos estériles de papel de filtro, las concentraciones probadas fueron de 5, 1, 0.5 y 0.25 mg/mL y utilizando antibiótico como blanco positivo. Los resultados obtenidos en esta prueba se muestran en la Tabla VI en la que se puede observar que las Saponinas tanto de *Agave lechuguilla* como de *A. lophanta* exhibieron actividad inhibitoria frente a *Helicobacter pylori* a las concentraciones de 5, 1, 0.5 y 0.25 mg/mL.

Tabla VI. Actividad inhibitoria de las saponinas obtenidas de *Agave lechuguilla* y de *A. lophantha* frente a *H. pylori*

Saponinas	Concentraciones mg/mL				Antibiótico
	5	1	0.5	0.25	
<i>A. lechuguilla</i>	+	+	+	+	+
<i>A. lophantha</i>	+	-	+	+	+

6.7 Citotoxicidad de saponinas de *A. lechuguilla*

6.7.1 Efecto de saponina de *A. lechuguilla* en células PBMC (células mononucleadas de sangre periférica, “*Peripheral Blood Mononuclear cells*”)

Utilizando los métodos de azul de tripano y MTT, la saponina esteroideal en concentraciones de 0.065 a 265 mg/mL (Fig. 31 y 32) muestra el 98 % de viabilidad de las células sanguíneas mononucleares, por lo que se considera que no son tóxicas para las células.

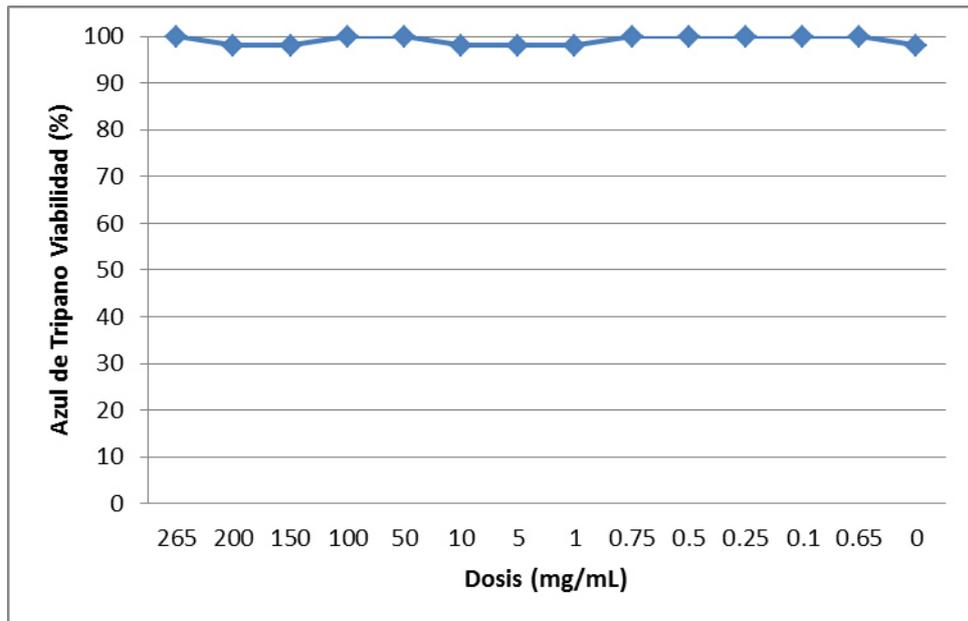


Figura 31. Viabilidad de células PBMC a diferentes concentraciones de saponina de *A. lechuguilla* con Azul de tripano

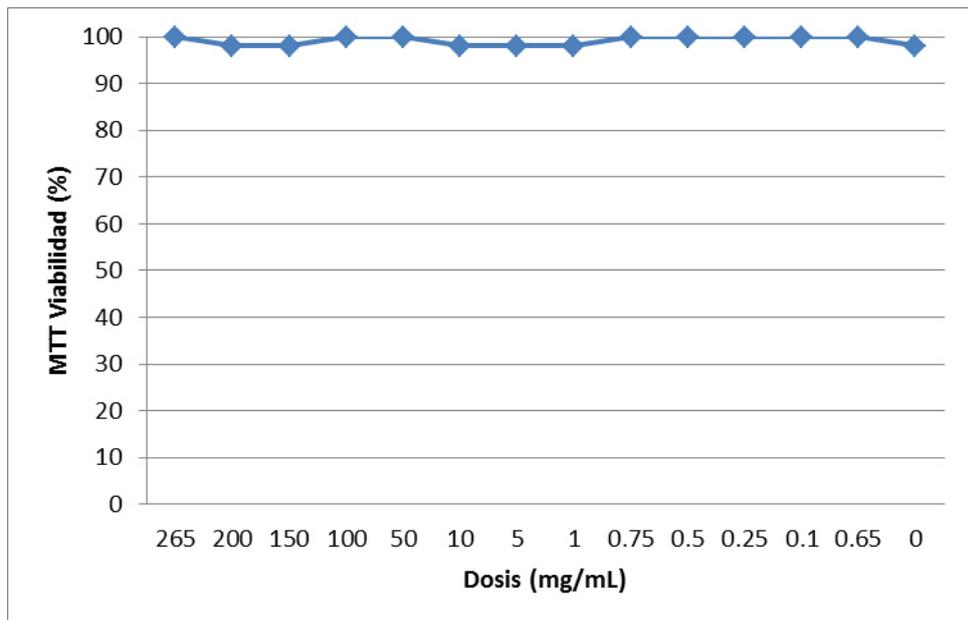


Figura 32. Viabilidad de células PBMC a diferentes concentraciones de saponina de *A. lechuguilla* con MTT

6.8 Identificación del compuesto activo:

El espectro IR (Fig. 33) muestra una señal a 3300 cm^{-1} correspondiente al enlace O-H y las características bandas de absorción de un núcleo espirostanos 25 R, a 1040 y $928 < 890\text{ cm}^{-1}$.

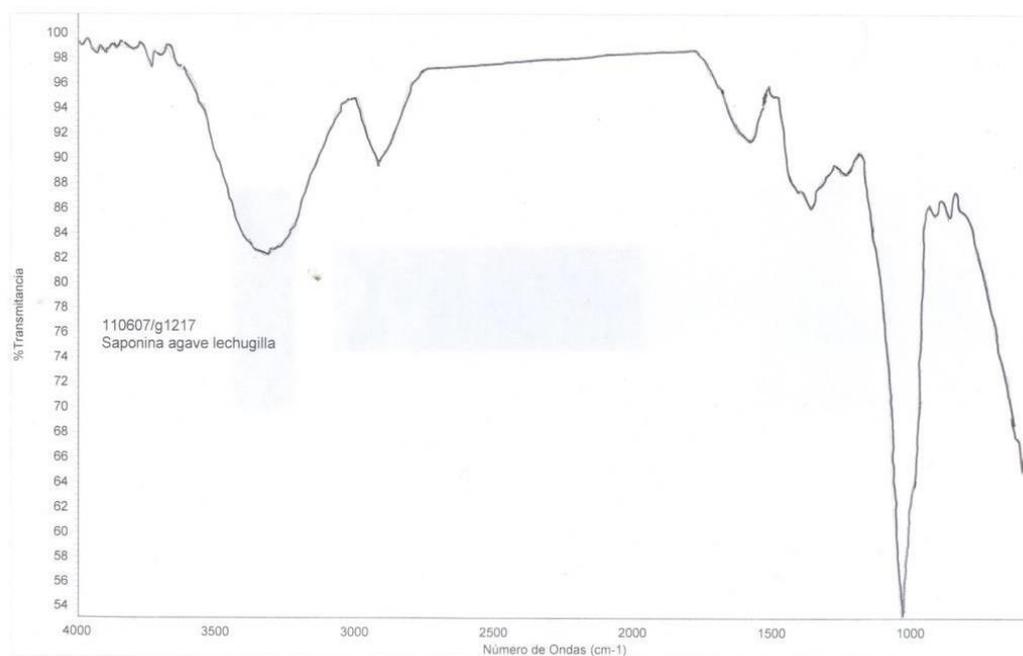


Figura 33. Espectro Infrarrojo de la saponina glicosilada de *A. lechuguilla*

El espectro de masas, MALDI-TOF MS (Figs 34 y 35) muestra un pico de ión positivo m/z 1197 $[M+H]^+$ y fragmentos m/z 1035 $[M+H-162]^+$, m/z 903 $[M+H-162-132]^+$, m/z 741 $[M+H-162-132-162]^+$, m/z 579 $[M+H-162-132-162 \times 2]^+$, m/z 417 $[M+H-162-132-162 \times 3]^+$, m/z 417 (pico base) correspondiente a la aglicona $[M+H]^+$ ($C_{27}H_{44}O_3$) y fragmentos m/z 399, m/z 381, m/z 273 y m/z 255.

calibrador

LECHUGUILLA FRAG 40EV 37 (3.100) AM2 (Ar,10000.0,0.00,0.00); ABS; Cm (12:59)

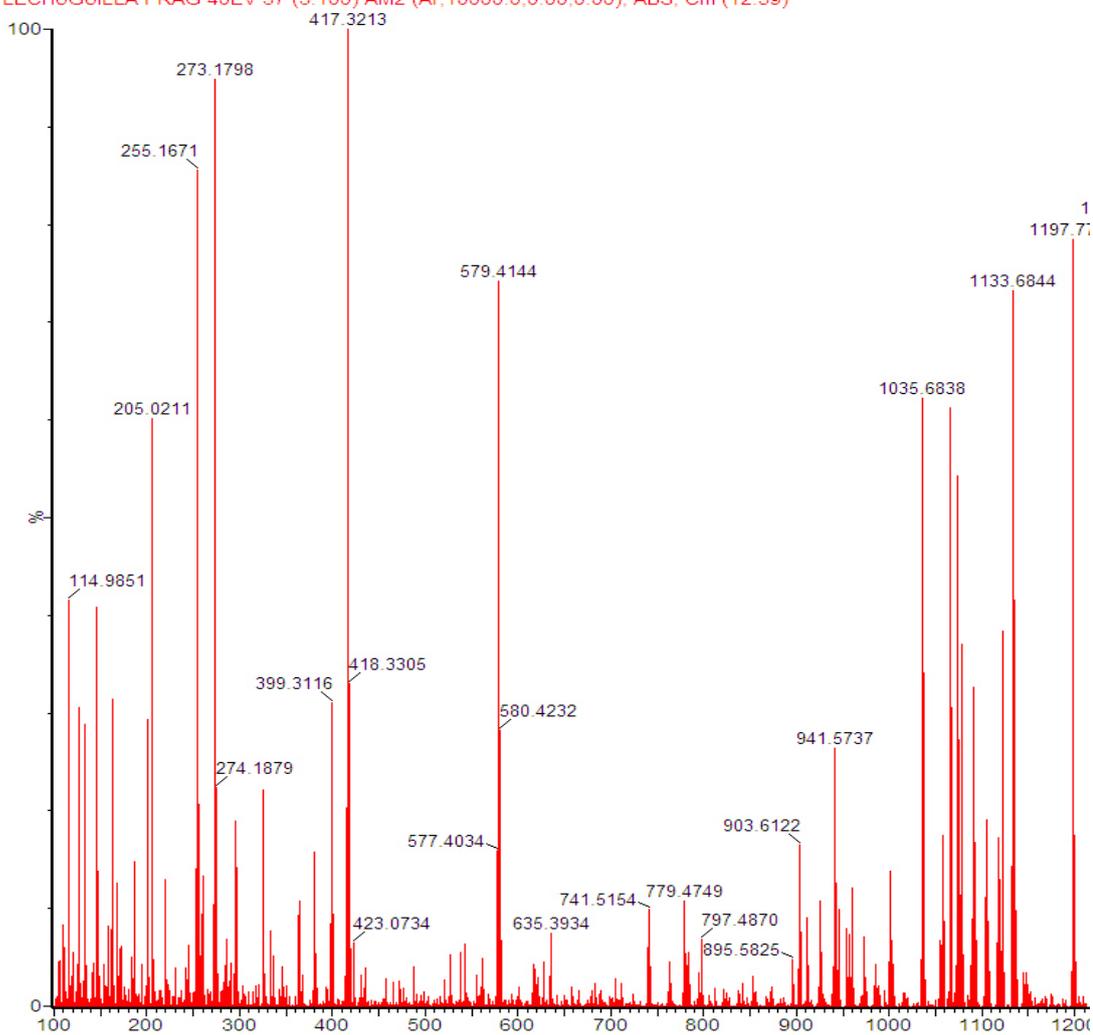


Figura 34. Espectro de Masas de la saponina glicosilada de *A.lechuguilla*

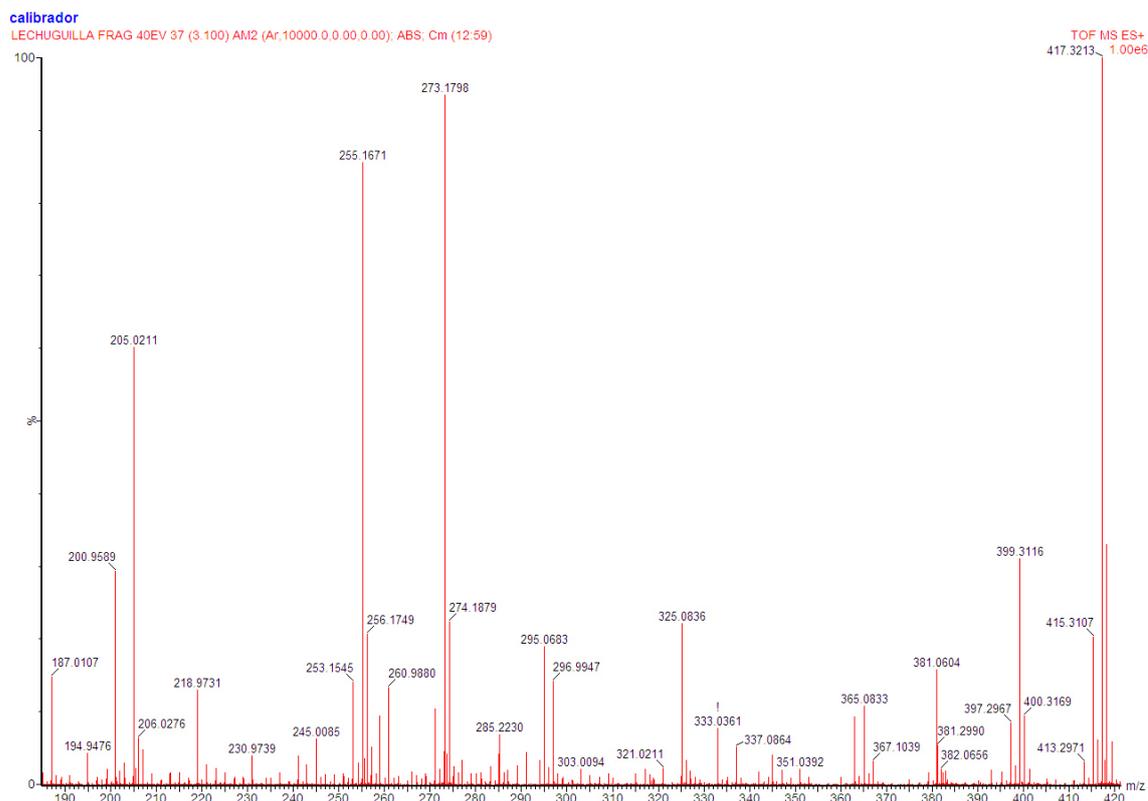
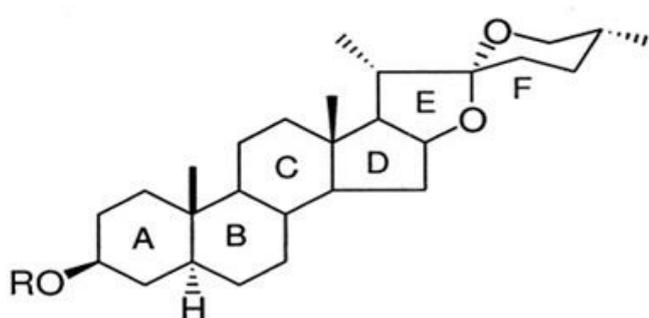


Figura 35. Espectro de masas de la aglicona

En base a las señales obtenidas en los espectros anteriores y las saponinas reportadas en *A. lechuguilla*, se propone la siguiente estructura, que corresponde a la Tigogenina glicosilada con 4 hexosas y una pentosa.



R =Substituyente glicosilado

Figura 36. Estructura de la saponina glicosilada de *A. lechuguilla* propuesta

7. DISCUSIÓN

En la actualidad está ampliamente aceptado que *Helicobacter pylori* es el agente etiológico de una infección gastrointestinal, que se expresa a través de diferentes formas clínicas: gastritis, enfermedad ulcerosa e inclusive un tipo histológico de cáncer gástrico. Por lo tanto resulta evidente la necesidad de abordar el problema mediante una terapia de erradicación de la bacteria.

Para ello existen diferentes esquemas de tratamiento antimicrobiano, pero la aplicación a gran escala de regímenes de antibióticos es costosa y presenta dificultades relacionadas con la aceptación de los pacientes, efectos colaterales, seguimiento del régimen de tratamiento debido a la complejidad de la terapia, que involucra por lo menos 3 fármacos, administrados en repetidas dosis, durante un largo periodo de tiempo, y también aparición de resistencia a los antibióticos que puede conducir a la disminución a mediano o largo plazo de la efectividad de este enfoque de tratamiento para esta importante afección (Vakil, N. & Mégraud, F., 2007; Wannmacher, L., 2011).

En tal sentido surge la necesidad de alternativas de tratamiento a los antimicrobianos existentes. Una opción a considerar es el uso de productos naturales, que en los últimos tiempos están alcanzando niveles mayores de aceptación, ello debido a su accesibilidad económica, baja tasa de efectos colaterales y la difusión de sus efectos benéficos

El propósito de este estudio fue evaluar el efecto antimicrobiano de los extractos de plantas de la familia Agavaceae sobre *Helicobacter pylori*, su citotoxicidad y conocer la naturaleza química del compuesto responsable de dicha actividad.

Para la identificación preliminar de grupos funcionales y metabolitos secundarios, se realizaron pruebas coloridas que revelaron la presencia de insaturaciones, alcaloides, carbohidratos y saponinas en los extractos metanólicos; en un estudio realizado para determinar cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios, evaluar su efecto antitumoral y la toxicidad de *A. lechuguilla*, Resendiz, *et al.*; (2005), reportó la presencia de saponinas, azúcares reductores, carbohidratos, aminoácidos libres, cumarinas, fenoles, taninos, triterpenos y esteroides en las hojas del *A. lechuguilla*.

Verástegui *et al* (2000), obtuvo extractos metanólicos de *A. lechuguilla*, *A. picta*, *A. scabra* y *A. lophanta* para evaluar actividad biológica y las pruebas a las que fueron sometidos los extractos detectaron la presencia de taninos, flavonas, cumarinas, azúcares y saponinas. Arizaga y Ecurra (2002), mencionan que las hojas o pencas de los agaves son fuente importante de metabolitos secundarios y pueden encontrarse particularmente saponinas. Esto concuerda con nuestros resultados en cuanto a la presencia de saponinas y carbohidratos en los extractos metanólicos de *A. lechuguilla* y *A. lophanta*. Con respecto a *A. victoria reginae* no se han encontrado referencias sobre identificación de metabolitos secundarios.

En las pruebas de evaluación antibacteriana de los extractos macerados en metanol sobre *H. pylori* utilizando la técnica de dilución en agar, los resultados de este estudio demuestran que dos de las especies de agaves tienen actividad antibacteriana frente a *H. pylori*. El extracto de *A. lechuguilla* tiene actividad a las concentraciones

de 10 y 5 mg/mL; y el extracto de *A. lophantha* solamente mostró actividad a la concentración de 10 mg/mL. El extracto de *A. victoria reginae* no mostró actividad a ninguna concentración. Estos resultados coinciden con un estudio realizado en el 2006 por Moreno, en este trabajo se probaron extractos metanólicos de *A. americana*, *A. lechuguilla* y *A. lophantha* sobre *H. pylori*, los resultados demostraron que los extracto de las dos últimas especies, poseen actividad antimicrobiana. Esto mismo se ha realizado en gran cantidad de plantas por ejemplo en un trabajo publicado en el 2007 por Castillo y Romero, reportaron más de 160 plantas para las cuales han confirmado el efecto anti *H. pylori*, sin embargo en esa lista no se incluye ninguna Agavacea.

Se han reportado a nivel mundial, una gran variedad de compuestos con actividad anti *H. pylori in vitro*, entre los cuales destacan flavonoides, taninos, cumarinas, terpenos, quinolonas y alcaloides (Palacios y col.; 2011), sin embargo, no existen reportes de compuestos de agaves, a excepción del estudio realizado por Moreno. Estos autores destacan otra área de interés que tienen los estudios sobre los compuestos vegetales activos contra *H. pylori*, consiste en el desarrollo de nuevos compuestos químicos a partir de la identificación de sustancias naturales que presenten una excelente actividad anti bacteriana.

Tomando en cuenta que los extractos metanólicos de *A. lechuguilla* y *A. lophantha* presentaron actividad frente a *H. pylori* se procedió a la separación de compuestos que fueran responsables de dicha actividad. Para esto se llevó a cabo el aislamiento de saponinas de los extractos activos de *A. lechuguilla* y de *A. lophantha*, las cuales presentaron aspecto viscoso, lo que concuerda con Martínez, M. A. (2001) que reporta las características de las saponinas obtenidas por él, como sólidos con la apariencia de una miel de color pardo oscuro que se solidifica, pero conserva su alta

viscosidad debido a la presencia de una gran cantidad de azúcares, esto se demostró cuando se desarrolló un color azul-verdoso mediante la prueba de la Antrona, que es característico de este tipo de compuestos y la presencia de saponinas se confirmó con la prueba de espuma y hemólisis.

Se han encontrado importantes actividades biológicas para muchas saponinas (Sparg, S. G.; *et al.*; 2004; Song, G.; *et al.*; 2009; Hostettmann, K.; *et al.*; 2002; Yao, X.; *et al.*; 2000; Martínez, M. A.; 2001), resaltando la actividad antibacteriana (De Leo, M.; *et al.*; 2006). Se tienen reportes de saponinas triterpénicas glicosiladas con actividad contra *H. pylori*, Krausse R y col (2004) encontraron que el ácido glicirrónico y en mayor medida el ácido glicirretínico fueron activos contra cepas claritromicina-resistentes de *H.pylori*. Cristian Ruiz y colaboradores (2007) aislaron una lipasa de *H. pylori* que ha sido descrita como causante del desarrollo de úlceras y reportan que el ácido glicirrónico y la escina, dos saponinas triterpénicas presentan actividades contra úlceras producidas por esta bacteria. Una saponina triterpénica glicosilada derivada del ácido oleanólico aislada de *Pteleopsis suberosa* Engl. Resultó con actividad relevante contra tres cepas metronidazol-resistentes de *H. pylori*.

Después de comprobar que la las saponina tiene efecto inhibitorio sobre *H.pylori* se llevó a cabo la evaluación de la actividad citotóxica en células mononucleares de sangre periférica CMSP, éstas son células sanguíneas que tienen un núcleo el cual es redondo, ejemplo de estas son los linfocitos, monocitos y fagocitos; son fundamentales para el funcionamiento del sistema inmune y combaten las infecciones y los cuerpos extraños; ya que estas células son de fácil obtención y manipulación, constituyen un modelo útil en la realización de ensayos *in vitro*, por lo que son ampliamente usadas para evaluar la toxicidad de compuestos químicos de

uso común como herbicidas (Martínez 2001) y, en investigación de productos naturales se utilizan para validar la seguridad del uso de plantas medicinales (Suganthi N. 2014, Nzowa LK 2013). En la saponina de *A. lechuguilla* no se encontró efecto citotóxico en dichas células determinado con azul de tripano y MTT y como puede observarse en las (Fig. 31 y 32) las CMSP tratadas con diferentes concentraciones de saponina, no presentaron efecto tóxico ya que mostraron una viabilidad de casi 100% con los dos métodos. En un estudio anterior Casillas y colaboradores (2009) probaron la toxicidad sobre *A. salina* de los extractos, hexánico, acetónico, etanólico y metanólico, de *A. lechuguilla*, los tres primeros extractos presentaron una LD₅₀ alrededor de 50 µg/mL, y el extracto metanólico presentó una LD₅₀ >500 µg/mL, lo que indica que no es tóxico, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo en el que se utilizó extracto metanólico.

Después de confirmar la actividad de la saponina de *A. lechuguilla* contra *H. pylori* y que no presentó toxicidad en las pruebas realizadas se procedió a llevar a cabo la identificación de la estructura de la saponina por métodos espectroscópicos.

Los picos del espectro infrarrojo son los característicos de un glicósido de una saponina esteroidal, estiramiento de enlace O-H 3331, C-H (2926), C-O1040 y señales del spiroacetal 938 y 880, además el hecho que la señal a 880 sea mayor que la de 938 nos indica que su configuración es 25 R (Fig. 33) como lo reportan varios autores (Ding Y 1989, Pi-Yu Chen 2011). La estructura química básica de una saponina esteroidal consiste en un esqueleto de una aglicona de 27 carbonos, con una cadena lateral que contiene de 4 a 7 monosacáridos unidos al carbón 3, generalmente: D-glucosa, L-rhamnosa, D-galactosa, ácido D-glucurónico, L-arabinosa, D-xylosa o D-fructosa (Vincken et al. 2007).

Como se observa en el espectro de masas (Fig. 34) donde la señal del ión molecular es m/z 1197 $[M+H]^+$ de lo que deducimos que su peso molecular es 1196 y fragmentos que nos indican la pérdida de monosacáridos; m/z 1035 $[M+H-162]^+$ ión molecular menos una hexosa; m/z 903 $[M+H-162 - 132]^+$ menos una hexosa y una pentosa; m/z 741 $[M+H-162-132-162]^+$ menos una hexosa, una pentosa y una hexosa; m/z 579 $[M+H-162-132- 162 \times 2]^+$ menos una hexosa, una pentosa y dos hexosas, m/z 417 $[M+H-162-132- 162 \times 3]^+$, Es el pico base que corresponde a la aglicona con peso de 416 y fórmula $C_{27}H_{44}O_3$.

Con las señales encontrados en el IR y espectro de masas deducimos que tenemos una saponina esteroideal con una aglicona $C_{27}H_{44}O_3$ (m/z 416), que tiene unido un oligosacárido formado por 4 hexosas y una pentosa.

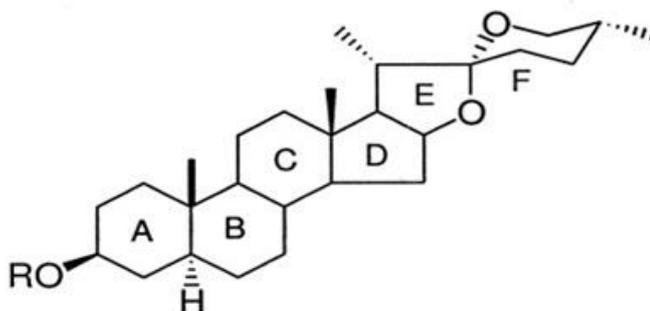
La relación quimiotaxonómica se ha establecido por comparación de la composición química de la saponina esteroideal aislada con los reportados de diferentes especies pertenecientes al género *Agave*, las agliconas principales de las especies de *Agave* son: hecogenina, rockogenina, gitogenina, diosgenina, yuccagenina y tigogenina (Ding et al., 1989; Macias et al., 2007; Mahato et al., 1982) y en *A. lechuguilla* se han identificado smilagenina y su isómero 25S, sarsapogenina (Camp et al., 1988), ruizgenina, tigogenina, gentrogenina, hecogenina, gitogenina, diosgenina, yucagenina, y clorogenina, (Blundel et al 1980, Mahato, AN 1982). La aglicona de *A. lechuguilla* aislada en este trabajo m/z 417 $(M+H)^+$ fue identificada por comparación de sus datos espectroscópicos con los resultados publicados por Dylan Ball (2010) quien reporta señales en: m/z 399, m/z 381, m/z 273 , m/z 255 como podemos observar en la figura 35 correspondientes al rompimiento de la tigogenina ésta ha sido reportada en otros agaves con diferente número de monosacaridos (Ding Yi et al 1989, Ohtsuki et al 2004). De *Agave Americana* se aislaron saponinas

esteroidales con aglicona tigogenina y diferente número y tipo de azúcares, entre ellas un oligosacárido formado por 4 hexosas y una pentosa (Figura 36), (Yang et al 2006) que de acuerdo a la quimitaxonomía de los agaves pudiera ser la obtenida en este estudio.

Es la primera vez que se reporta en *A. lechuguilla*, tigogenina con 4 hexosas y una pentosa, esta estructura es consistente con los estudios que se han realizado sobre la relación estructura/ actividad (SAR por sus siglas en inglés) de estos compuestos; ya que sus funciones biológicas se atribuyen a las características estructurales de las saponinas y su naturaleza ambifílica, por la presencia de moléculas de azúcar hidrofílicas y la aglicona hidrofóbica (Vincken et al. 2007).

El número y la secuencia del oligosacárido parecen ser importantes para la actividad biológica en especial la citotóxica. En 2001, Mimaki *et al.*, reportaron algunas relaciones estructura/actividad (SAR) de saponinas esteroidales, los compuestos fueron principalmente aislados de las plantas liliáceas y se probaron contra células de leucemia promielocítica humana HL-60. La diosgenina b-D-glucósido no resultó activa, sin embargo una molécula adicional de a-L-rhamnopiranosil en C-2 de la glucosa aumentó considerablemente la actividad. Esto también fue confirmado por los estudios en saponinas aisladas de *Agave fourcroydes*, clorogenina, hecogenina y tigogenina con seis azúcares (con la misma secuencia de cadenas de monosacáridos) las cuales mostraron actividad sobre células HeLa (IC₅₀ 13.1, 5.2, and 4.8 μ g/ml, respectivamente), mientras los diglucosidos fueron inactivos (Ohtsuki et al. 2004). En la actividad antifúngica la cadena de azúcares juega un rol importante así Yang et al reportan que si el compuesto posee menos de 4 monosacáridos la saponina es inactiva.

En base a las señales obtenidas en los espectros anteriores y las saponinas reportadas en *A. lechuguilla*, se propone la siguiente estructura, que corresponde a la Tigogenina glicosilada con 4 hexosas y una pentosa.



R =Substituyente glicosilado

Fig 36 Estructura de la saponina glicosilada propuesta por Yang

8. CONCLUSIONES

- ✓ El mayor rendimiento de los agaves estudiados fue el de *Agave lechuguilla* con 17.46% y el de menor rendimiento fue de *Agave victoria reginae* con 11.14%.
- ✓ La actividad contra *H. pylori* de los agaves estudiados fue de 10 y 5 mg/mL para *A. lechuguilla* y 10 mg/mL para *A. lophantha*. *A. victoria reginae* no mostró actividad.
- ✓ Los grupos funcionales y metabolitos secundarios encontrados con estudios preliminares fueron principalmente: Insaturaciones, Saponinas, Carbohidratos y Alcaloides.
- ✓ El rendimiento de saponinas aisladas de *A. lechuguilla* y de *A. lophantha* fue de 2.24 g y 1.25 g respectivamente.
- ✓ La actividad sobre *H. pylori* de las saponinas de los agaves activos fue: 5, 1, 0.5 y 0.25 mg/mL.
- ✓ La citotoxicidad evaluada en células mononucleadas de sangre periférica (“*Peripheral Blood Mononuclear cells*”) de la saponina del *A. lechuguilla* a las concentraciones de 0.065 a 265 mg/mL con MTT y azul de tripano fue de 98%.
- ✓ La estructura propuesta de acuerdo a los espectros IR y de Masas, es la de una Tigogenina glicosilada con 4 hexosas y una pentosa. Es la primera vez que se reporta esta saponina glicosilada en *A. lechuguilla*.

9. LITERATURA CITADA

Abdo Francis JM, Uscanga Domínguez L, Sobrino Cossío, *et al.* 2007. III Censo Mexicano sobre *Helicobacter pylori*. Rev Gastroenterol Mex. 72(3): 321-328.

Achtman M, Azuma T, Douglas Berg, Ito Y, Morelli G, Pan Z, Suerbaum S, Stuart A, Ende A and Doorn L. 1999. Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. Molecular Microbiology; 32: 459-70.

Adelman A. 1996. Using serology to detect *Helicobacter pylori* infection. J. Fam. Pract. 43:2:118-119.

Alarcón T, Vega E, Domingo D, *et al.* 2003. Clarithromycin resistance among *Helicobacter pylori* strains isolated from children: Prevalence and Study of Mechanism of Resistance by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. J Clin Microbiol; 41: 486-88.

Ángel AC. 1999. Estudio fitoquímico preliminar, citotoxicidad y determinación de la actividad antitumor de extractos etanólicos de *Cucumis dipsacus*. Química Farmacéutica. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Química Farmacéutica. Bogotá. 81 p.

Antonioli, D. A. 1990. Gastric carcinoma and its precursors. p. 144. In H. Goldman, H. D. Appelman, N. Kaufman, and . (eds.), Gastrointestinal Pathology. United States and Canadian Academy of Pathology.

Arizaga S & Escurra E. 1995. Insurance against reproductive failure in a semelparous plant: bulbil formation in *Agave macroacantha* flowering stalks. Oecologia 101: 329-334.

Arizaga S. 1998. Biología Reproductiva de *Agave macroacantha* Zucc. en Tehuacán, Puebla. Tesis Doctoral. UNAM, Facultad de Ciencias.

Arizaga SE, Escurra E, Peters E, Ramírez de Arellano y Vega E. 2000. Pollination ecology of *Agave macroacantha* (Agavaceae) in a Mexican tropical desert. II. The role of pollinators. *American Journal of Botany* 87: 1011-1017.

Arizaga S. y Escurra E. 2002. "Propagation mechanisms in *Agave acroacantha* (Agavaceae), a tropical arid-land succulent rosette" en *American Journal of Botany*. 89(4): 632-641.

Asaka M, Takeda H, Sugiyama T and M. Kato. 1997. What role does *Helicobacter pylori* play in gastric cancer? *Gastroenterology* 113:S56-S60.

Augustin JM, Kuzina V, Andersen S B, Bak, S. 2011. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry* 72, 435-457.

Ávalos GA, Pérez-Urria CE. 2009. Metabolismo Secundario de Plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal. 2(3): 119-145. ISSN: 1989-3620.

Ayala G, Chihu L, Perales G, Fierros-Zárate G, Hansen LM, Solnick JV, Sánchez J. 2004. Quantitation of *H pylori* cytotoxin mRNA by real-time RT-PCR shows a wide expression range that does not correlate with promoter sequences. *Microbial Pathogenesis* 37:163-167.

Bachran C, Bachran S, Sutherland M, Bachran D, Fuchs H. 2008. Saponins in tumor therapy. *Mini Rev. Med. Chem.*, 8, 575-584.

Barer, M. R. 2000. Bacterial growth and physiology, p. 36-44. *In* D. Greenwood, R. C. B. Slack, and J. F. Peutherer (eds.), *Medical Microbiology. A guide to microbial infections: Pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and control*. Churchill Livingstone.

Bennet RN, Wallsgrove RM. 1994. Secondary metabolites in plant defense mechanisms. *New Phytologist* 127: 617-633.

Bhakuni DS & Rawat DS. 2005. *Bioactive Marine Natural Products*. Anamaya Publishers, New Delhi. 382 p.

Bhalla R, Narasimhan K, Swarup S. 2005. Metabolomics and its role in understanding cellular responses in plants. *PlantCellRep* 24:562-571

Blaser, M.J. 2005. *Helicobacter pylori*: Its role in disease. *Clinical Infectious diseases*. 15:386-396-45.

Blunden G, Carabot A, Cripps AL, Jewers K. 1980. Ruizgenin, a new steroidal sapogenin diol from *Agave lecheguilla*. *Steroids*. 35(5):503-10

Bosques-Padilla FJ, Tijerina-Menchaca R, Pérez-Pérez GI, Flores-Gutiérrez JP, Garza-González E. 2003. Comparison of *Helicobacter pylori* prevalence in symptomatic patients in northeastern Mexico with the rest of the country: its association with gastrointestinal disease. *Arch. Med. Res.* 34:60-63.

Brock TD & Madigan MT. 1993. *Microbiología*. Prentice Hall Hispanoamericana, S. A., Estado de México. 956 p.

Camp BJ, Bridges CH, Hill DW, Patamalai B, Wilson S. 1988. Isolation of a steroidal sapogenin from the bile of a sheep fed *Agave lecheguilla*. *Vet Hum Toxicol*. 30(6):533-5

Cannell RJP. 1998. *Natural Products Isolation*, Humana Press, Totowa, New Jersey. pp. 53-230.

Castillo-Juárez I, Romero I. 2007. Plantas con actividad anti-*Helicobacter pylori*: una revisión. *Bol.Soc.Bot.Méx.* 80: 35-61.

Castillo-Juárez I, González V, Jaime-Aguilar H, Martínez G, Linares E, Bye R, Romero I. 2009. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *J Ethnopharmacol*. 18;122(2):402-5.

Chapman PB, Morrissey DM, Panageas KS, Hamilton WB, Zhan C, Destro AN. 2000. Induction of antibodies against GM2 ganglioside by immunizing melanoma patients using GM2-keyhole limpet hemocyanin + QS-21 vaccine: a dose-response study. *Clin. Cancer Res.*, 6, 874-879.

Chihu, L. *et al.* 2005. Antimicrobial resistance and characterization of *Helicobacter pylori* strains isolated from Mexican adults with clinical outcome. *J. Chemother.* 17, 270-276.

Chihu L, Ayala G, Mohar A, Hernández A, Herrera-Goepfert R, Fierros G, González-Márquez H, Silva, J. 2005. Antimicrobial resistance and characterization of *Helicobacter pylori* strains isolated from mexican adults and clinical outcome. *J. Chemother.* 17:12-18.

Chin YW, Balunas MJ, Chai HB & Kinghorn AD. 2006. Drug discovery from natural sources. *The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal* 8(2): E239-E253.

Chinou I. 2008. Primary and secondary metabolites and their biological activity. En: (Eds) *Thin layer chromatography in phytochemistry*, pp. 59-76. CRS Press, Boca Raton.

Chisholm S.A, Owen R. J, Teare E. L and S. Saverymuttu. 2001. PCR-based diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and real-time determination of clarithromycin resistance directly from human gastric biopsy samples. *J Clin Microbiol* 39:1217-1220.

Chisholm S.A, Teare E, Patel B, Owen RJ. Determination of *Helicobacter pylori vacA* allelic types by single-step multiplex PCR. *Let in Appl Microbiol.* 2002; 35:42 – 6.

Coleman JJ, Okoli I, Tegos GP, Holson EB, Wagner FF, Hamblin MR, Mylonakis E. 2010. Characterization of plant-derived saponin natural products against *Candida albicans*. *ACS Chem. Biol.*, 5, 321-332.

Cordero CC. 2002. Implementación de un método *in vitro* de evaluación preliminar de actividad anticáncer de extractos vegetales empleando líneas celulares de tumores humanos. Tesis pregrado. Universidad nacional de Colombia. Química Farmacéutica.

Correa P. 1996. *Helicobacter pylori* and gastric cáncer: state of the art. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 5: 477-81.

Correa, P. 1992. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 52:6735-6740.

Correa, P. 1982. Precursors of gastric and esophageal cancer. *Cancer* 50:2554-2565.

Correa, P. and V. W. Chen. 1994. Gastric cancer. *Cancer Surv* 19-20:55-76.

Correa P, Haenszel W, Cuello C, Zavala D, Fontham E, Zarama G, Tannenbaum S, Collazos T, Ruiz B. 1990. Gastric precancerous process in a high risk population: cohort follow-up. *Cancer Res* 50:4737-4740.

Correa P, Haenszel W, Cuello C, Zavala D, Fontham E, Zarama G, Tannenbaum S, Collazos T, Ruiz B. 1990. Gastric precancerous process in a high risk population: cross-sectional studies. *Cancer Res* 50:4731-4736

Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M. 1975. A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet* Jul 12;2 (7924):58-60.

Cover TL and Blaser MJ. 1996. *Helicobacter pylori* infection, a paradigm for chronic mucosal inflammation: pathogenesis and implications for eradication and prevention. *Adv Intern Med* 41:85-117.

Cragg GM, Newman DJ. 2005. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. *PureApplChem* 77:7-24

De Leo M., De Tommasi N, Sanogo R, D'Angelo V, Germano MP, Bisignano G, Braca A. 2006. Triterpenoid saponins from *Pteleopsis suberosa* stem bark. *Phytochemistry*. 67, 2623-

Delmas F, Di Giorgio C, Elias R, Gasquet M, Azas N, Dekanosidze G, Kemertelidze E, Timon-David P. 2000. Antileishmanial activity of three saponins isolated from ivy, α -hederin, β -hederin and hederacolchiside A1, as compared to their action on mammalian cells cultured *in vitro*. *Planta Med.*, 66, 343-347.

Del Val AG, Platas G, Basilio A, Cabello A, Gorrochategui J, Suay I, Vicente F, Portillo E, Jiménez del Río M, García-Reina G & Peláez F. 2001. Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macro algae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). *Internatl. Microbiol.* (4): 35-40.

Dewick PM. 2009. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 3rd. Edition. ISBN 978-0-470-74168-9 (cloth) – ISBN 978-0-470-74167-2 (pbk: alk. paper).

Ding Y, Yan-Yong, De-J and Chong-Ren Y. 1989. Steroidal saponins from a cultivated form of *Agave sisalana*. *Phytochemistry*. 28 (10): 2787-91

Dixon, M. 2001. Pathology of Gastritis and Peptic Ulceration., p. 459-469. In H.L.T.Mobley, G.L.Mendz, and S.L.Hazell (eds.), *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. ASM press., Washington, DC.

Doenges J. L. 1938. Spirochetes in the gastric glands of macacus rhesus and humans without definite history of related disease. *Proc Soc Exp Med Biol.*; 38: 536 – 38.

Domínguez X. A. 1979. Métodos de investigación fitoquímica. Editorial LIMUSA, S.A. de C.V. México, D.F.

Doorn LJ, Glupczynski Y, Kuster JG, Megraud F, Midolo P, Maggi-Solca N, Queiroz DM, Nouhan N, Stet E, Quint WG. 2001. Accurate Prediction of macrolide resistance in *Helicobacter pylori* by PCR Line Probe Assay for detection of mutations in the 23 S RNAr gene: Multicenter Validation Study. *Antimicrob Agents Chemother*. 45: 1500-4.

Doorn LJ, Quint W, Schneeberger P, Tygat GN, de Boer W. 1997. The only good. *Helicobacter pylori* is a dead *Helicobacter pylori*. *Lancet*. 350: 71 -72.

Dunn B.E, Cohen H and Blaser MJ. 1997. *Helicobacter pylori*. *Clin. Microbiol. Rev*. 10:720-741.

Dylan Ball. 2010. Refinement of LC-MS Methodology for the Analysis of Saponins. Thesis. Masters of Science in Chemistry at The University of Waikato. Hamilton, New Zealand: 89-91

El Omar EM, Penman I. D, Ardill JE, Chittajallu RS, Howie C and McColl K. E. 1995. *Helicobacter pylori* infection and abnormalities of acid secretion in patients with duodenal ulcer disease. *Gastroenterology* 109:681-691.

Eguiarte L, Souza V, Silva-Montellano A. 2000. Evolución de la familia Agavaceae: Filogenia, biología reproductiva y genética de poblaciones. Boletín de la Sociedad Botánica de México 66, 131-150.

Evans TG, McElrath MJ, Matthews T, Maontefiori D, Weinhold K, Wolff M. 2001. QS-21 promotes an adjuvant effect allowing for reduced antigen dose during HIV-1 envelope subunit immunization in humans. Vaccine, 19, 2080-2091.

Farthing MJ. 1998. *Helicobacter pylori* infection: an overview. Br Med Bull 54:1-6.

Fiehn O. 2002. Metabolomics: The link between genotypes and phenotypes. Plant Mol Biol 48:155-171.

Ford, A. *et al.* 2006. Eradication therapy for peptic ulcer disease in *Helicobacter pylori* positive patients (rev). Cochrane Database Syst. Rev.:CD003840.

Francis G, Kerem Z, Makkar HPS, Becker K. 2002. The biological action of saponins: a review. Br. J. Nutr., 88, 587-605.

Freshney R I 2000. Culture of animal cell. A manual of basic technique. Cuarta edición. John Wiley and sons. Inc. New York.

Fuchs H, Bachran D, Panijdeh H. 2009. Saponins as tool for improved targeted tumor therapies. Curr. Drug Targets, 10, 140-151.

Fujimura S, *et al.* 2004. *In vitro* activity of fluoroquinolone and the *gyrA* gene mutation in *Helicobacter pylori* strains isolated from children. J. Med. Microbiol. **53**, 1019-1022.

Fukai T, Marumo AI, Kiyoshi K, *et al.* 2002. Anti-*Helicobacter pylori* flavonoids from licorice extract. Life Science 71, 1449-63.

García, A. 1995. "Riqueza y endemismos de la familia Agavaceae en México", en E. Linares, P. Dávila, F. Chang, R. Bye y T. Elias (Eds.), Conservación de plantas en peligro de extinción: Diferentes enfoques, 51-71. México: Instituto de Biología, UNAM.

García-Mendoza A. y Galván, R. 1995. "Riqueza de la familia Agavaceae y Nolinaceae en México" en Boletín de la Sociedad Botánica de México. 56: 7-24.

Garza-Gonzalez E, Perez-Perez GI, Alanis-Aguilar O, Tijerina-Menchaca R, Maldonado-Garza HJ, Bosques-Padilla FJ. 2002. Antibiotic susceptibility patterns of *Helicobacter pylori* strains isolated from northeastern Mexico. J Chemother; 14(4):342-345.

Garza-González E, Bosques-Padilla FJ, Tijerina-Menchaca R, Pérez-Pérez GI. 2006. Characterization of *Helicobacter pylori* isolates from the north-eastern region of Mexico. Clin Microbiol Infect. 12:97-98.

Garza-González E, Giasi-González E, Matínez-Vázquez MA, et al. 2007. Erradicación de *H. pylori* y su relación con la resistencia a los antibióticos y el estatus de CYP2C19. Rev Esp Enferm Dig; 99: 71-5.

Gauthier C, Legault J, Girard-Lalancette K, Mshvildadze V, Pichette 2009. A. Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins. Bioorg. Med. Chem., 17, 2002-2008.

Gentry H.S. 1982. Agaves of Continental North America. Tucson: The University of Arizona Press.

Gilger, M. A. 2000. Treatment of *Helicobacter pylori* infection in children. Curr Pharm Des 6:1531-1536.

Gisbert, J.P. 2008. "Rescue" regimens after *Helicobacter pylori* treatment failure. *World J. Gastroenterol.* 14, 5385-5402.

Gleba D, Borisjuk N, Borisjuk L, Kneer R, Poulev A, Skarzhinskaya S, Logendra S, Gleba Y, Raskin I. 1999. Use of plant roots for phyto remediation and molecular farming. ProcNatlAcadSci 96:5973-5977

Glocker E, Bogdan C and Kist, M. 2008. Characterization of rifampicin resistant clinical *Helicobacter pylori* isolates from Germany. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 874-879.

Go MF. 1997. What are the host factors that place an individual at risk for *Helicobacter pylori*–associated disease? *Gastroenterology* 113:S15-S20.

Gomes BC, De Martinis ECP. 2004. Fate of *Helicobacter pylori* artificially inoculated in lettuce and carrot samples. *Brazilian J. Microbiol.* 35:145-150.

Gomes BC, De Martinis ECP. 2004. The significance of *Helicobacter pylori* in water, food and environmental samples. *Food Control* 15:397-403.

Gómez-Pompa A. 1963. “El género Agave” en Cactáceas y Suculentas Mexicanas. 8: 3-25.

González-Morales, J. E., L. Leal-Villareal, S. Guzmán-López, G. M. Guzmán-Treviño, N. A. González-Martínez. 2004. *Helicobacter pylori* y enfermedad. *Rev. Alergia México.* 51(6):218-225.

González JE, Leal VL, Guzmán S, Guzmán GM, González NA. 2004. *Helicobacter pylori* y enfermedad. *Rev. Alergia México.* 51(6):218-225.

Goodwin C and Armstrong JA. 1990. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur J Clin Microbiol* 9:1-13.

Graham, D.Y. *et al.* 2007. A report card to grade *Helicobacter pylori* therapy. *Helicobacter* **12**, 275-278.

Graham DY, Opekun A. R, Osato MS, El Zimaity HM, Lee CK, Yamaoka Y, Qureshi WA, Cadoz M, Monath TP. 2004. Challenge model for *Helicobacter pylori* infection in human volunteers. *Gut* 53:1235-1243.

Gur G, Boyacioglu S, Gul C, Turan M, Gursoy M, Baysal C, Ozdemir N. 1999. Impact of *Helicobacter pylori* infection on serum gastrin in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 14:2688-2691.

Gurib-Fakim A. 2006. Medicinal plants: Tradition of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med.* 27: 1-93.

Gutiérrez RA, Estévez BA. 2009. Relevancia de los Productos Naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el siglo XXI. Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. (Esp). Vol. 103, No. 2, pp 409-419. X Programa de Promoción de la Cultura Científica y Tecnológica.

Guttman A, Khandurina J, Budworth P, Xu W, Hou Y-M, Wang X. 2004. Analysis of combinatorial natural products by HPLC and CE. *PharmaGenomics* 4:32- 42

Haq N. 2004. *In vitro* production of bioactive compounds from medicinal and aromatic plants [en línea] En: <<http://www.telmedpak.com>>

Hernández S, Lugo E, Díaz L, y Villanueva S. 2005. Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de *Agave lechuguilla* Torrey. Revista digital científica y tecnológica. Universidad de Guadalajara. México (3).

Hofman P, Waidner B, Hofman V, Bereswill S, Brest P, Kist M. 2004. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 9:15-22.

Horiki N, *et al.* 2009. Annual change of primary resistance to clarithromycin among *Helicobacter pylori* isolates from 1996 through 2008 in Japan. *Helicobacter* 14, 86-90.

Hostettman K, Marston A. 1995. "Chemistry and Pharmacology of Natural Products. Saponins", Cambridge University Press, New York, NY., 548 pp, ISBN 0-521-32970- 1.

Hostettmann K, Marston A. 1995. "Saponins". Cambridge University Press, Cambridge, UK; 1-10.

Hostettmann, K, Marston N, Ndjuko K, Wolfender JL. 2000. The potential of African plants as a source of drugs. *Curr Org Chem* 4:973-1010

Hostettmann K, Marston A. 2002. Twenty years of research into medicinal plants: Results and perspectives. *Phytochemistry Reviews* 1, 275-285.

Huang JQ, Sridhar S, Chen Y and Hunt R. H. 1998. Meta-analysis of the Relationship Between *Helicobacter pylori* Seropositivity and Gastric Cancer. *Gastroenterology* 114:1169-1179.

IARC. 1994. *Monographs on the evaluation of the Carcinogenic risks to human*. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. Lyon: International Agency for Research on Cancer. Vol. 61. 177-240.

Icarito. Úlcera. 20 de agosto 2005. Ref Type: Internet Communication.

Ikeda T, Tsumagari H, Honbu T, Nohara T. 2003. Cytotoxicactivity of steroidal glycosides from solanum plants. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 26, 1198-1201.

Imrie C, Rowland M, Bourke B and Drumm B. 2001. Is *Helicobacter pylori* infection in childhood a risk factor for gastric cancer? *Pediatrics* 107:373-380.

Innocenti M, Svennerholm AM, Quiding J. M. 2001. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides preferentially induce CXC chemokine production in human monocytes. *Infect Immun* 69:3800-3808.

Jaki B U, Franzblau SG, Chadwick LR, Lankin DC, Zhang F, Wang Y & Pauli GF. 2008. Purity – Activity Relationships of Natural Products: The Case of Anti-TB Active UrsolicAcid. *J. Nat. Prod.* (71): 1742 – 1748.

Kato I, Tominaga S, Ito Y, Kobayashi S, Yoshii Y, Matsuura A, Kameya A, Kano T. 1992. Atrophic gastritis and stomach cancer risk: cross-sectional analyses. *Jpn J Cancer Res* 83:1041-1046.

Kearney DJ. 2003. *Helicobacter pylori* Infection. *Current Treatment Options in Infectious Diseases* 5:197-206.

Kim YJ, Kwon HC, Ko H. 2008. Anti-tumor activity of the ginsenoside Rk1 in human hepatocellular carcinoma cells through inhibition of telomerase activity and induction of apoptosis. *Biol. Pharm. Bull.*, 31, 826-830.

Konoshima T. 1996. Anti-tumor-promoting activities of triterpenoid glycosides; cancer chemo prevention by saponins. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 404, 87-100.

Konturek PC, Konturek SJ and Brzozowski T. 2006. Gastric Cancer and *Helicobacter pylori* Infection. *J. Physiol. Pharmacol.* 57(3):51-65.

Krausse R, Bielenberg J, Blaschek W, Ullmann U. 2004. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of Extractum liquiritiae, glycyrrhizin and its metabolites. *J Antimicrob Chemother.* Jul;54(1):243-6. Epub 2004 Jun 9.

Lambert JR, Lin S. K and Aranda MJ. 1995. *Helicobacter pylori*. *Scand J. Gastroenterol Suppl* 208:33-46.

Lee A, Dixon M. F, Danon S. J, Kuipers E, Megraud F, Larsson H, Mellgard B. 1995. Local acid production and *Helicobacter pylori*: a unifying hypothesis of gastroduodenal disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 7:461-465.

Leal-Herrea Y, Torres J, Monath TP, Ramos I, Gomez A, Madrazo-de la Garza A, Dehesa-Violante M, Munoz O. 2003. High rates of recurrence and transient reinfections of *Helicobacter pylori* in a population with high prevalence of infection. *Am. J. Gastroenterol.* 98:2395-2402.

Livingston PO, Adluri S, Helling F, Yao TJ, Kensil CR, Newman MJ. 1994. Phase I trial of immunological adjuvant QS-21 with a GM2 ganglioside-keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccine in patients with malignant melanoma. *Vaccine*, 12, 1275-1280.

Logan RPH and M. M. Walker. 2001. ABC of the upper gastrointestinal tract. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *BMJ* 323:920-922.

López-Brea M, Alarcón T, Baquero M, Domingo D, Royo G. 2004. Procedimientos en Microbiología Clínica. Diagnóstico microbiológico de la infección por *Helicobacter pylori*. Procedimientos en Microbiología Clínica, SEIMC.

Macías FA, Guerra JO, Simonet A M, and Nogueira C. 2007. Characterization of the fraction components using 1D TOCSY and 1D ROESY experiments. Four new spirostane saponins from *Agave brittoniana* Trel. Spp. *Brachypus*. *Magn. Reson. Chem.* 45: 615–620

Mahato SB, Ganguly AN, and Sahu NP. 1982. Review Steroid Saponins *Phytochemistry.* 21(5): 959-78

Makunga NP, van Staden J. 2008. An efficient system for the production of clonal plantlets of the medicinally important aromatic plant: *Salvia africana-lutea* L. *PlantCellTissOrganCult* 92:63-72

Malfertheiner, P. *et al.* 2007. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 56, 772-781.

Man S, Gao W, Zhang Y, Huang L, Liu C. 2010. Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. *Fitoterapia*, 81, 703-714.

Martínez PI. 2000. Las plantas medicinales. *Revista Cubana de Oncología.* 16(1):66

Martínez M, Ferreira R, González M. 2008. *Helicobacter pylori* en pacientes con diferentes enfermedades gastroduodenales.

Martínez M A. 2001. Saponinas esteroides. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica. Medellín.

Martínez, Adriano, Reyes, Ismael, Reyes, Niradiz. Citotoxicidad del glifosato en células mononucleares de sangre periférica humana *Biomédica* [en línea] 2007, 27 (diciembre): [Fecha de consulta: 13 de marzo de 2014] Disponible en: <<http://redalyc.org/articulo.oa?id=84327414>> ISSN 0120-4157

Maskchek JA and Baker BJ. 2008. The Chemistry of Secondary Metabolism. En: Amsler, CD. (Ed). *Algal Chemical Ecology.* Springer-Verlag, 313.

Matsukura N, Onda M. y Tokunaga H. 1995. Tissue IgA antibody against *Helicobacter pylori* in patients with gastroduodenal diseases:

comparison with bacterial culture, serum IgG antibody, and [13C] urea breath test. *J Clin Gastroenterol.* 21:1:S146-S150.

McColl, KE. 1992. *Helicobacter pylori* colonization and alterations in gastric physiology. p. 198-208. In B. Rathbone and R. V. Heatley (eds.), *Helicobacter pylori* and Gastrointestinal Disease. Blackwell Scientific, Oxford.

McGee DJ, Mobley HLT. 2000. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Curr Opin. Gastroenterol.* 16:23-31

McVaugh, R. 1989. Flora Novo-Galiciana. Volume 15. Bromeliaceae to Dioscoreaceae. The University of Michigan Herbarium. Ann Arbor. 398 pp.

Mégraud F. 1995. Diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Clin Gastroenterology.* 1995. 9: 507– 18.

Mégraud F. 2007. *Helicobacter pylori* and antibiotic resistance. *Gut* **56**, 1502.

Mégraud F. 2000. Strategies to treat patients with antibiotic resistant *Helicobacter pylori*. *Internat. J. of Antimicrob. Agents* **16**, 507– 509.

Mégraud F, Corti R. 2009. Resistencia bacteriana del *Helicobacter pylori* en el mundo en el año 2009. *Acta Gastroenterol. Latinoam.* **39**, 282-290 .

Méndez-Sánchez, N y Uribe EM. 2010. Gastroenterología. Segunda Edición. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V. ISBN: 978-970-10-7349-0. México, D.F.

Mitchell, H. M. 2001. Epidemiology of infection, p. 7-18. In H. L. T. Mobley, G. L. Mendz, and S. L. Hazell (eds.), *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. ASM press, Washington, DC.

Mimaki Y, Yokosuka A, Kuroda M, and Sashid Y. 2001. Cytotoxic Activities and Structure–Cytotoxic Relationships of Steroidal Saponins. *Biol. Pharm. Bull.* 24(11): 1286-89.

Mimaki Y, Kuroda M, Kameyama A, Yokosuka A, Sashida Y. 1998. New steroidal constituents of the underground parts of *Ruscus aculeatus* and their cytostatic activity on HL-60 cells. *Chem. Pharm. Bull.*, 46, 298-303.

Mimaki Y, Kuroda M, Kameyama A, Yokosuka A, Sashida Y. 1998. Steroidal saponins from the underground parts of *Ruscus aculeatus* and their cytostatic activity on HL-60 cells. *Phytochemistry*, 48, 485-493.

Mimaki Y, Kuroda M, Obata Y, Sashida Y, Kitahara M, Yasuda A, Naoi N, Xu ZW, Li MR, Lao AN. 2000. Steroidal saponins from the rhizomes of *Paris polyphylla* var. *chinensis* and their cytotoxic activity on HL-60 Cells. *Nat. Prod. Lett.*, 14, 357-364.

Mimaki Y, Yokosuka A, Kuroda M, Sashida Y. 2001. Cytotoxic activities and structure-cytotoxic relationships of steroidal saponins. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 24, 1286-1289.

Miyakoshi M, Tamura Y, Masuda H, Mizutani K, Tanaka O, Ikeda T, Ohtani K, Kasai R, Yamasaki K. 2000. Antiyeast steroidal saponins from *Yucca schidigera* (Mohave Yucca), a new anti-food-deteriorating agent. *Journal of Natural Products*, 63, 332-338.

Mokuolu AO, Sigal SH y Lieber CS. 1997. Gastric juice urease activity as a diagnostic test for *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol.* 92:4:644-648.

Molina, F. y Eguiarte, L. (2003). "The pollination biology of two paniculate Agaves from northwestern México: contrasting roles of bats as pollinators" en *American Journal of Botany*. 90: 1016-1024.

Molina-Salinas GM. 2001. Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos y hexánico del clavo (*Eugenia caryophyllata*). UANL. Fac. de Medicina. Escuela de Graduados.

Molina-Salinas G. M., 2004. Aislamiento y caracterización de compuestos con actividad bactericida y/o bacteriostática de plantas del noreste de México sobre cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensibles y multidrogaresistentes. Tesis, Facultad de Medicina. UANL.

Moreno Vieyra, M. L. 2006. Tesis. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* por medio de extractos de *Agave Americana*, *Agave lechuguilla* y *Agave lophantha*. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas.

Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65: 55-63.

Murillo-Álvarez JI, Encarnación DR & Franzblau SG. 2001. Antimicrobial and cytotoxic activity of some medicinal plants from Baja California Sur (México). *Pharmaceutical Biology*, (39): 445 – 449.

Nagorni A. 2000. *Helicobacter pylori* at the end of the second millennium. *Facta Universitatis* 7:15-25.

Nobel PS. 1988. Environmental biology of Agaves and Cacti. Cambridge: Cambridge University Press.

Nzowa LK, Teponno RB, Tapondjou LA, Verotta L, Liao Z, Graham D, Zink MC, Barboni L. 2013 Two new tryptophan derivatives from the seed kernels of *Entada rheedii*: effects on cell viability and HIV infectivity. *Fitoterapia* 87:37-42.

O'Rourke J, Bode G. 2001. Morphology and Ultrastructure. In: *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics. (eds. Mobley, H. L. T., Mendz, G. L. & Hazell, S. L.) 53-67 (ASM Press Washington).

Ogura K, *et al.* 2000. Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in mongolian gerbil. *J. Exp. Med.* **192**, 1601-1609.

Ohtsuki T, Koyano T, Kowithayakorn T, Sakai S, Kawahara N, Goda Y, Yamaguchi N, Ishibashi M. 2004. New chlorogenic hexasaccharide isolated from *Agave fourcroydes* with cytotoxic and cell cycle inhibitory activities. *Bioorg. Med. Chem.* 15:3841-45.

Oleastro MA, Menard A, Santos H, Lamouliatte L, Monteiro P, Barthelemy and F. Megraud. 2003. Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 41:397-402.

Ortiz PD, Cavazza ME, Rodríguez O, Hagel I, Correnti M, Convit J. 2003. Prevalencia de la infección por *helicobacter pylori* en comunidades de la etnia warao del estado delta amacuro, Venezuela. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 98: 7221-725.

Owen RJ. Molecular testing for antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. Gut. 2002; 50: 285 – 9.

Owen RJ. Molecular testing for antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. Gut. 2002; 50: 285 – 9.

Páez MC, Barón MA, Solano L, Nadaff G, Boccio J. y Barrado A. 2006. Infección por *Helicobacter pylori* (13C-UBT) y factores nutricionales y socioeconómicos asociados en escolares de estratos bajos de la ciudad de Valencia. Venezuela. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 56: 342-349

Palacios EF, Escobedo HW, Romero I. 2011. Panorama actual del estudio de las plantas con actividad anti-*Helicobacter pylori*. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 14(1):51-61.

Panchal PV, Forman JS, Blumberg DR, Wilson KT. 2003. *Helicobacter pylori* infection: pathogenesis. Curr. Opin. Gastroenterol. 19:4-10.

Parsonnet, J. 1998. *Helicobacter pylori*. Infect Dis Clin North Am 12:185-197.

Pérez-Pérez GI, Rothenbacher D, Brenner H. 2004. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter. 9:1-6.

Pérez AN, Jiménez E. 2011. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. Biotecnología Vegetal. Vol. 11, No. 4: 195-211 ISSN: 1609-1841.

Pérez LKR. 2012. Síntesis y caracterización de análogos y miméticos de saponinas espirostánicas. Tesis. Universidad de la Habana. Facultad de Química. Centro de Estudios de Productos Naturales. La Habana, Cuba.

Pezzuto JM. 1995. Natural product cancer chemoprotective agents. En: Arnason JT, Mata R, Romeo JT (Eds). Recent advances in phytochemistry. *Phytochemistry of medicinal plants*, 29, pp. 19-45. New York.

Piven N, Barredo F, Borges I, Herrera M, Mayo A, Herrera L, Robert M. 2001. Reproductive biology of henequén (*Agave fourcroydes*) and its wild ancestor *Agave Angustifolia* (Agavaceae).i. Gametophyte development. *American Journal of Botany*. 88: 1966-1976.

Pi-Yu Chen, Chin-Hui Chen, Ching-Chuan K, Tzong-Huei L, Yueh-Hsiung K, Ching-Kuo L. 2011. Cytotoxic Steroidal Saponins from *Agave sisalana*. *Planta Med*. 77: 929-33.

Pitt TL. 2000. Classification and identification of micro-organisms, p. 25-35. In D. Greenwood, R. C. B. Slack, and J. F. Peutherer (eds.), *Medical Microbiology. A guide to microbial infections: Pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and control*. Churchill Livingstone.

Ramos CF.2009. Agentes antinoplásicos en plantas tóxicas del norte de México. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas.

Rao AV, Sung MK. 1995. Saponins as anticarcinogens. *J. Nutr.*, 125, 717S-724S.

Rautelin H, Seppälä K, Renkonen OV, Vainio U and Kosunen TU. 1992. Role of metronidazole resistance in therapy of *Helicobacter pylori* infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 163-166.

Repetto M & Camean A. 1995. *Toxicología Avanzada*. Ediciones Díaz de Santos España. ISBN: 84-7978-201-3

Resendiz EE, Montejano RJR, Almaguer VG, Trejo GM, Pérez MV, Martín GJM. 2005. Fitoquímica, efecto antitumoral en un modelo de linfoma 15178y y toxicidad aguda oral del *A. gave lechuguilla* Torrey (lechuguilla)

en ratones CD1Laboratorio de Farmacognosia. Área Académica de Farmacia, Instituto de Ciencias de la Salud, UAEH.

Romo GC, Coria JVR. *Helicobacter pylori*, un modelo de bacteria carcinogénica. 2010. Revista Especializada en Ciencias Médico-Quirúrgicas. pp. 242-251, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado. México.

Rothery GA and Day D. W. 1985. Intestinal metaplasia in endoscopic biopsy specimens of gastric mucosa. J Clin Pathol 38:613-621.

Rugge MF, Farinati R, Baffa F, Sonogo F, Di Mario G, Leandro and Valiante F. 1994. Gastric epithelial dysplasia in the natural history of gastric cancer: a multicenter prospective follow-up study. Interdisciplinary Group on Gastric Epithelial Dysplasia. Gastroenterology 107:1288-1296.

Rugge MG, Leandro F, Farinati, F, Di Mario F. Sonogo M, Cassaro M, Guido and V. Ninfo. 1995. Gastric epithelial dysplasia. How clinicopathologic background relates to management. Cancer 76:376-382.

Ruiz C, Falcocchio S, Pastor FIJ, Saso L, Diaz P. 2007. *Helicobacter pylori* EstV: identification, cloning and characterization of the first lipase isolated from an epsilon-proteobacterium. Appl Environ Microbiol 73: 2423–2431. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]

Sajc L, Grubisic D, Vunjak-Novakovic G. 2000. Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. Biochemical Engineering Journal 4:89-99

Sarin R. 2005. Useful metabolites from plant tissue cultures. Biotechnology 4: 79-93.

Sarker SD, Nahar L & Kumarasamy Y. 2007. Micro titreplate-based antibacterial assay in incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. Methods, 42(4): 321 – 324.

Shahid, M, *et al.* 2009. Plant natural products as a potential source for antibacterial agents: Recent trends. Curr. Med. Chem. 8, 211- 225.

Shilpa K, Varun K, Lakshmi BS. 2010. An alternate method of natural drug production: Eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. *J. Plant Sci* 5: 222-227

Silva-Montellano, A y Eguiarte LE. 2003. Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan Desert. I. Floral characteristics, visitors, and fecundity. *American Journal of Botany* 90(3): 377–387.

Simala-Grant JL, Taylor DE. 2004. Molecular biology methods for the characterization of *Helicobacter pylori* infections and their diagnosis. *APMIS*. 112: 886-97.

Slauson LA. 2000. Pollination biology of two chiropterophilous agaves in Arizona. *American Journal of Botany* 87: 825–836.

Song G, Yang S, Zhang W, Cao Y, Wang P, Ding N, Zhang Z, Guo Y, Li Y. 2009. Discovery of the first series of small molecule H5N1 entry inhibitors. *J. Med. Chem.*, 52, 7368-7371.

Sparg SG, Light M E, Van Staden. 2004. J. Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology.*, 94: 219-243.

Steven J, Czinn MD *et al.* 2005. *Helicobacter pylori* infection: Detection, investigation and management. *J Pediatr* 146: 21-26.

Stone G, Shortridge D, Versalovic J, Beyer J, Flamm R, Graham D, Ghoneim A and Tanaka K. 1997. A PCR-Oligonucleotide ligation assay to determine the prevalence of 23 S RNAr gene mutations in Clarithromycin-Resistant *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41: 712 – 14.

Suganthy N, Karthikeyan K, Archunan G, Karutha Pandian S, Pandima Devi K. 2014. Safety and toxicological evaluation of *Rhizophora mucronata* (a mangrove from Vellar estuary, India): assessment of mutagenicity, genotoxicity and in vivo acute toxicity. *Mol Biol Rep.* 2014 Mar;41(3):1355-71.

Sun HX, Xie Y, Ye YP. 2009. Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine*, 27, 1787-1796.

Topal D, Goral V, Yilmaz F and Kara I. H. 2004. The relation of *Helicobacter pylori* with intestinal metaplasia, gastric atrophy and BCL-2. *Turk J Gastroenterol* 15:149-155.

Torres J, López L, Lazcano E, Camorlinga M, Flores L, Muñoz O. 2005. Trends in *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in Mexico. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14:1874-1877.

Traore F, Faure R, Olivier E, Gasquet M, Azas N, Debrauwer L, Keita A, Timon-David P, Balansard G. 2000. Structure and antiprotozoal activity of triterpenoid saponins from *Glinus oppositifolius*. *Planta Med.*, 66, 368-371.

Thomas JE, Gibson GR, Darboe MK, Dale A, Weaver LT. 1992. Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. *Lancet* 340:1194-1195.

Vakil N & Mégraud F. 2007. Eradication Therapy for *Helicobacter pylori*. *Reviews in basic and clinical Gastroenterology. Gastroenterol.* 133, 985-1001.

Vallejo MC, Enríquez MA, López MR, Valdez JA, Pérez Pría KP. 2010. *Helicobacter pylori* en pacientes de la tercera edad atendidos en un hospital de Puebla. *Enf Inf Microbiol.* 29: 131-134

Vasilyeva IS, Paseshnichenko VA. 2000. Steroid glycosides of the plants and the cell cultures of *Dioscorea* species: Metabolism and biological activity. *Uspekhi Biologicheskoi Khimii*, 40, 153-204.

Verástegui MM. 2000. Evaluación de la actividad antimicrobiana de compuestos de Agaves y su acción sobre el tigmotropismo y dimorfismo de *Candida albicans*. Tesis de postgrado. Facultad de Ciencias Biológicas. UANL.

Versalovic, J. 2003. *Helicobacter pylori*. Pathology and diagnostic strategies. *Am J Clin Pathol* 119:403-412.

Vincken JP, Heng L, Groot A, Gruppen H. 2007. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*. 68(3):275-97

Villar del Fresno, Ángel María. *Farmacognosia General*. 1999. Editorial Síntesis. S. A. ISBN: 8477386404 ISBN – B: 9788477386407

Vincken JP, Heng, Groot A, Gruppen H. 2007. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*. 68(3):275-97

Wade LG. 2006. *Química Orgánica*. Quinta Edición. Pearson. ISBN ID:84-205-4102-8. Pearson Prentice Hall.

Walsh JH and Peterson WL. 1995. The treatment of *Helicobacter pylori* infection in the management of peptic ulcer disease. *N Engl J Med* 333:984-991.

Wannmacher, L. 2011. Review of the evidence for *H. pylori* treatment regimens. In Technical report series. pp. 33. Report of 18th expert committee on the selection and use of essential medicines. (WHO).

Warren JR, Marshall BJ. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1: 1311-5.

Woo HY, Park D, Park H, Kim M, Kim D, Kim IS. 2009. Dual Priming Oligonucleotide base multiplex PCR for the detection of *Helicobacter pylori* and determination of clarithromycin resistance with Gastric Biopsy Specimens. *Helicobacter*. 14: 22 – 28.

Yamazaki S, Kato S, Matsukura N, *et al.* 2005. Identification of *Helicobacter pylori* and the *cagA* genotype in gastric biopsies using highly sensitive realtime PCR as a new diagnostic tool. *FEMS Immunol Med Microbiol*; 4

Yang, Chong-Ren Y, Ying Z, Melissa RJ, Shabana IK, Yin-Jun Z, and Xing-Cong L. 2006. Antifungal activity of C-27 Steroidal Saponins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* . 50 (5) 1710-14

Yang QX, Yang CR. 2006. Cytotoxic steroidal saponins from *Polygonatum punctatum*. Chem. Biodiver., 3, 1349-1355.

Yao X, Hu K, Dong A. 2000. Steroid glycoside compounds for treating cancer and preparation method thereof. Patent number CN 1243129.

Yokosuka A, Mimaki Y, Sashida Y. 2000. Steroidal saponins from *Dracaena surculosa*. J. Nat. Prod., 63, 1239-1243.

Yokosuka A, Mimaki Y. 2009. Steroidal saponins from the whole plants of *Agave utahensis* and their cytotoxic activity. Phytochemistry, 70, 807-815.

Yokosuka A, Jitsuno M, Yui S, Yamazaki M, Mimaki Y. 2009. Steroidal glycosides from *Agave utahensis* and their cytotoxic activity. J. Nat. Prod. 72(8): 1399-140

Zhang JD, Cao YB, Xu Z, Sun H, An M, Yan L, Chen HS, Gao PH, Wang Y, Jia XM., Jiang Y. 2005. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the eight steroid saponins from *Tribulus terrestris* L with potent activity against fluconazole-resistant fungal pathogens. Biol. Pharm. Bull., 28, 2211-2215.

Zhao YL, Cai GM, Hong X, Shan LM, Xiao XH. 2008. Anti-hepatitis B virus activities of triterpenoid saponin compound from *Potentilla anserine* L. Phytomedicine, 15, 253-258.

Zhu HL, *et al.* 2007. Metronidazole-Flavonoid derivatives as anti-*Helicobacter pylori* agents with potent inhibitory activity against HPE-Induced Interleukin-8 production by AGS cells. Chem. Med. Chem. 2, 1361-1369.