



**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEÚTICAS Y BIOQUÍMICAS**



**LA FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS DE LA UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES AUTORIZA EL USO DE LA INFORMACION CONTENIDA EN ESTE DOCUMENTO SI LOS PROPOSITOS SON ESTRICTAMENTE ACADEMICOS.**

**LICENCIA DE USO**

El usuario está autorizado a:

- a) visualizar el documento mediante el uso de un ordenador o dispositivo móvil.
- b) copiar, almacenar o imprimir si ha de ser de uso exclusivamente personal y privado.
- c) copiar textualmente parte(s) de su contenido mencionando la fuente y/o haciendo la referencia correspondiente respetando normas de redacción e investigación.

El usuario no puede publicar, distribuir o realizar emisión o exhibición alguna de este material, sin la autorización correspondiente.

**TODOS LOS DERECHOS RESERVADOS. EL USO NO AUTORIZADO DE LOS CONTENIDOS PUBLICADOS EN ESTE SITIO DERIVARA EN EL INICIO DE ACCIONES LEGALES CONTEMPLADOS EN LA LEY DE DERECHOS DE AUTOR.**

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ÁNDRES  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS  
CARRERA DE BIOQUIMICA



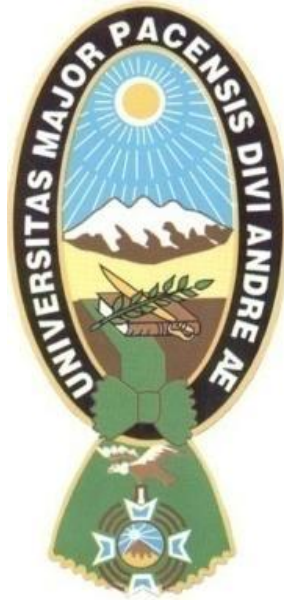
**Evaluación de la actividad anti-*Helicobacter pylori* del Aceite Esencial, Acido Ursólico y sus dos modificaciones estructurales extraídos del *Clinopodium bolivianum* (Khoa), mediante las técnicas Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) por dilución en agar y difusión con disco.**

Tesis de grado presentada para la obtención del grado de Licenciatura

**POR: MARISEL MERCEDES MAMANI MAMANI**

LA PAZ – BOLIVIA  
Diciembre, 2013

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ÁNDRES  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS  
CARRERA DE BIOQUIMICA



**Evaluación de la actividad anti-*Helicobacter pylori* del Aceite Esencial, Acido Ursólico y sus dos modificaciones estructurales extraídos del *Clinopodium bolivianum* (Khoa), mediante las técnicas Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) por dilución en agar y difusión con disco.**

Tesis de grado presentada para la obtención del grado de Licenciatura

**POR: MARISEL MERCEDES MAMANI MAMANI**

**Tutores:** Eduardo Gonzales Davalos Ph.D

Miriam Ghiomar Quisbert Gutiérrez Lic.

Benigno Mamani Cuenca Lic.

LA PAZ – BOLIVIA  
Diciembre, 2013

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ÁNDRES FACULTAD DE  
CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS  
CARRERA DE BIOQUIMICA**

Tesis de grado:

**Evaluación de la actividad anti-*Helicobacter pylori* del Aceite Esencial, Acido Ursólico y sus dos modificaciones estructurales extraídos del *Clinopodium bolivianum* (Khoa), mediante las técnicas Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) por dilución en agar y difusión con disco.**

Presentada por: Univ. Marisel Mercedes Mamani Mamani

Para obtener el grado académico de *Licenciada en Bioquímica*

Nota numeral:.....

Nota literal:.....

Ha sido: .....

Director de la carrera de Bioquímica: Dr. Bernardo Torrico

Tutor: Ph.D. Eduardo Gonzales Dávalos

Tutor: Lic.Miriam GhiomarQuisbert Gutiérrez

Tutor: Lic.Benigno Mamani Cuenca

Tribunal: Ph.D. Teresa Alvarez

Tribunal: Ph.D. Alberto Jiménez

Tribunal: Dr. Miguel A. Estensoro



**Dedicatoria.**

*El presente trabajo esta dedicado a mis padres que fueron la fuente de mi inspiración y fortaleza para terminar este trabajo. A mis hermanos por su apoyo incondicional y sabios consejos.*

## **Agradecimientos**

*Agradecer a Dios por permitirme conocer a tantas personas que fueron los que estuvieron conmigo en cada etapa de este trabajo.*

*A mis papás por estar a mi lado como una fuente de apoyo incondicional y sabios consejos*

*A mis hermanos por confiar en mi cada momento, por su apoyo incondicional, sus consejos y colaboraciones.*

*A mis amigas Patricia Loza, Andrea García y Beatriz Poma por estar a mi lado apoyándome, aconsejándome y sobre todo ser mis confidentes, por todo el apoyo brindado en cada etapa del trabajo.*

*Al doctor Eduardo Gonzales que desde el primer momento que ingrese al IIFB fue quien me presto su colaboración, brindándome una gama de conocimientos en cada etapa del presente trabajo.*

*A Benny por todo su apoyo sus consejos y sus recomendaciones por que a pesar de contar con poco tiempo fue el que más apoyo me dieron este trabajo.*

*A Miriam por ser una guía en este trabajo.*

*A la doctora Georgina por apoyarme, brindarme su amistad y darme sabios consejos, a pesar del corto tiempo que tuvimos en conocernos fue la que mas apoyo me dio en la etapa final del trabajo.*

*A los compañeros del IIFB que me acogieron y apoyaron con la investigación realizado en este periodo de investigación.*

# Índice

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Antecedentes</b>	<b>5</b>
<b>1.2. Planteamiento del problema</b>	<b>8</b>
<b>1.3. Objetivos</b>	<b>11</b>
<b>1.3.1. Objetivo general</b>	<b>11</b>
<b>1.3.2. Objetivos específicos</b>	<b>11</b>
<b>1.4. Hipótesis</b>	<b>14</b>
<b>2. Marco teórico</b>	<b>14</b>
<b>2.1. Descripción de la planta en estudio.</b>	<b>14</b>
<b>2.1.1. Historia</b>	<b>14</b>
<b>2.1.2. Sinónimos</b>	<b>15</b>
<b>2.1.3. Nombre popular</b>	<b>15</b>
<b>2.1.4. Situación taxonómica</b>	<b>16</b>
<b>2.1.5. Origen y distribución</b>	<b>17</b>
<b>2.1.6. Descripción botánica</b>	<b>17</b>
<b>2.1.7. Composición química</b>	<b>18</b>
<b>2.1.7.1. Acido Ursólico</b>	<b>19</b>
<b>2.1.7.2. Aceite Esencial.</b>	<b>20</b>
<b>2.1.8. Usos tradicionales y prácticos.</b>	<b>22</b>
<b>2.1.9. Acción farmacológica.</b>	<b>22</b>

<b>2.2.</b>	<b>Descripción de la bacteria en estudio: <i>Helicobacter pylori</i>.</b>	<b>26</b>
2.2.1.	Historia de la <i>Helicobacter pylori</i> .	26
2.2.2.	Clasificación taxonómica.	29
2.2.3.	Especie del Género <i>Helicobacter</i> .	30
2.2.4.	Hábitat.	32
2.2.5.	Características generales y Morfología.	33
2.2.6.	Factores de patogenicidad que contribuye a la colonización.	34
2.2.6.1.	Ureasa.	35
2.2.6.2.	Sistemas antioxidantes	36
2.2.6.3.	Flagelos	36
2.2.6.4.	Adhesinas	37
2.2.7.	Factor de virulencia.	38
2.2.8.	Identificación bioquímica.	39
2.2.9.	Fisiopatología de la <i>Helicobacter pylori</i>	39
2.2.9.1.	Colonización gástrica	39
2.2.9.2.	Patologías asociadas a la <i>Helicobacter pylori</i>	40
2.2.10.	Técnicas para el diagnóstico del <i>Helicobacter pylori</i> .	47
2.2.10.1.	Métodos invasivos	47
2.2.10.2.	Métodos no invasivos	52
2.2.11.	Tratamiento para <i>Helicobacter pylori</i>	54
2.2.11.1.	Causas de fracaso del tratamiento.	57
2.2.11.2.	Pruebas de sensibilidad antimicrobiana	57



<b>3. Diseño metodológico</b>	<b>59</b>
<b>3.1. Equipos</b>	<b>59</b>
<b>3.2. Materiales</b>	<b>59</b>
<b>3.3. Reactivos</b>	<b>60</b>
<b>3.4. Métodos</b>	<b>60</b>
<b>3.4.1. Material vegetal.</b>	<b>60</b>
<b>3.4.1.1. Obtención del Aceite Esencial, Acido Ursólico y sus dos modificaciones estructurales del <i>Clinopodium bolivianum</i>.</b>	<b>61</b>
<b>3.4.2. Determinación de la actividad anti <i>Helicobacter pylori</i>.</b>	<b>62</b>
<b>3.4.2.1. Recuperación de cepas de <i>Helicobacter pylori</i>.</b>	<b>62</b>
<b>3.4.2.2. Preparación de la muestra.</b>	<b>62</b>
<b>3.4.2.3. Medio de cultivo.</b>	<b>63</b>
<b>3.4.2.4. Incubación.</b>	<b>63</b>
<b>3.4.2.5. Identificación.</b>	<b>63</b>
<b>3.4.2.6. Aislamiento del microorganismo de <i>Helicobacter pylori</i>.</b>	<b>65</b>
<b>3.4.2.7. Difusión con disco del Acido Ursólico y sus dos modificaciones estructurales del <i>Clinopodium bolivianum</i>.</b>	<b>66</b>
<b>3.4.2.8. Difusión con disco del aceite esencial del <i>Clinopodium bolivianum</i>.</b>	<b>67</b>
<b>3.4.2.9. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) por dilución en agar con antibiótico.</b>	<b>68</b>

3.4.2.10.	Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) por dilución en agar con Acido Ursólico y sus dos modificaciones estructurales del <i>Clinopodium bolivianum</i> .	69
3.4.2.11.	Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) por dilución en agar con aceite esencial del <i>Clinopodium bolivianum</i> .	70
3.5.	Estadísticas	70
4.	<b>Resultados y Discusión</b>	71
4.1.	Rendimiento de aceite esencial del <i>Clinopodium bolivianum</i> por el método de arrastre de vapor.	71
4.2.	Técnica de difusión con disco.	72
4.3.	Técnica Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) por dilución en agar.	80
5.	<b>Conclusión</b>	85
6.	<b>Recomendaciones</b>	87
7.	<b>Bibliografía</b>	88
8.	<b>Anexos</b>	106

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Planta <i>Clinopodium bolivianum</i>	<b>14</b>
<b>Figura 2.</b> Descripción botánica del <i>Clinopodium bolivianum</i> .	<b>18</b>
<b>Figura 3.</b> a) Acido Ursólico y b) Acido Oleanólico.	<b>19</b>
<b>Figura 4:</b> Característica morfológica del <i>Helicobacter pylori</i>	<b>33</b>
<b>Figura 5.</b> Factores de patogenicidad de la <i>Helicobacter pylori</i> .	<b>34</b>
<b>Figura 6.</b> Patologías asociadas a la <i>Helicobacter pylori</i> .	<b>41</b>
<b>Figura 7.</b> Imagen endoscópica de gastritis crónica.	<b>42</b>
<b>Figura 8:</b> Esquema para la obtención del Aceite Esencial del <i>Clinopodium bolivianum</i>	<b>61</b>
<b>Figura 9:</b> Esquema para el aislamiento de <i>Helicobacter pylori</i>	<b>65</b>
<b>Figura 10:</b> esquema para la técnica de difusión en disco con el Acido Ursólico y Sus dos modificaciones estructurales.	<b>66</b>
<b>Figura 11:</b> Esquema para la técnica de difusión con disco del Aceite esencial del <i>Clinopodium bolivianum</i>	<b>67</b>
<b>Figura 12:</b> Esquema de la técnica de dilución en agar del control positivo (tetraciclina).	<b>68</b>
<b>Figura 13:</b> Esquema de la técnica de dilución en agar con el Acido Ursólico y sus dos modificaciones estructurales del <i>Clinopodium bolivianum</i> .	<b>69</b>
<b>Figura N 14:</b> Esquema de la técnica de dilución en agar del Aceite esencial del <i>Clinopodium bolivianum</i>	<b>70</b>
<b>Figura 15:</b> Actividad Anti- <i>Helicobacter pylori</i> de la Tetraciclina.	<b>73</b>
<b>Figura 16:</b> Actividad Anti- <i>Helicobacter pylori</i> del Acido Ursólico y sus dos modificaciones estructurales frente al control negativo.	<b>75</b>
<b>Figura 17:</b> Actividad Anti- <i>Helicobacter pylori</i> del Aceite Esencial frente al control negativo y positivo.	<b>78</b>

**Figura 18:** Susceptibilidad *in vitro* de la Tetraciclina de 15 cepas de *Helicobacter pylori* mediante la técnica del MIC por dilución en agar. 80

**Figura 19:** Comparación del control positivo frente al Acido Ursólico y sus modificaciones en 15 cepas de *Helicobacter pylori* mediante la técnica del MIC por dilución en agar. 82

**Figura 20:** Susceptibilidad *in Vitro* del Aceite Esencial de 15 cepas de *Helicobacter pylori* mediante la técnica del MIC por dilución en agar. 83



## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Composición del Aceite Esencial de <i>Clinopodium bolivianum</i> .	<b>21</b>
<b>Tabla N 2:</b> Actividad Antibacteriana del <i>Clinopodium bolivianum</i>	<b>23</b>
<b>Tabla 3.</b> Actividad Anti fúngica del <i>Clinopodium bolivianum</i>	<b>24</b>
<b>Tabla 4:</b> Actividad Insecticida del <i>Clinopodium bolivianum</i>	<b>24</b>
<b>Tabla 5:</b> Diferentes especies del genero <i>Helicobacter</i> .	<b>31</b>
<b>Tabla 6:</b> Principales factores de virulencia.	<b>38</b>
<b>Tabla 7:</b> Tratamientos para la erradicación de la infección por <i>H. pylori</i> .	<b>56</b>
<b>Tabla 8:</b> Rendimiento en porcentaje volumen/masa del Aceite Esencial <i>Clinopodium bolivianum</i> .	<b>71</b>
<b>Tabla 9:</b> Actividad Anti- <i>Helicobacter pylori</i> de la Tetraciclina por la técnica de impregnación en disco	<b>73</b>
<b>Tabla 10:</b> Actividad Anti- <i>Helicobacter pylori</i> del Acido Ursólico y sus dos modificaciones estructurales frente al control negativo y control positivo.	<b>75</b>
<b>Tabla 11:</b> Actividad Anti- <i>Helicobacter pylori</i> del Aceite Esencial frente al control negativo y control positivo	<b>78</b>
<b>Tabla 12:</b> Susceptibilidad in Vitro de la Tetraciclina frente al Acido Ursólico y sus dos modificaciones estructurales de 15 cepas de <i>Helicobacter pylori</i> mediante la técnica del MIC por dilución en agar.	<b>81</b>
<b>Tabla 13:</b> Susceptibilidad in Vitro del Aceite Esencial de 15 cepas de <i>Helicobacter pylori</i> frente al control positivo mediante la técnica del MIC por dilución en agar.	<b>84</b>

## Resumen

**Introducción:** *Helicobacter pylori* es una bacteria que tiene una relación directa con el desarrollo de la enfermedad gastroduodenal. Se estima que más del 50% de la población mundial está infectada por esta bacteria. La terapia empleada para la erradicación de la bacteria falla en más del 20%, principalmente por la generación de resistencia a los antibióticos comerciales. **Justificación:** *Helicobacter pylori* es un organismo microaerófilo que coloniza e infecta la mucosa gástrica humana. En el área IIFB de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas se lleva a cabo estudios sobre las plantas de la herbolaria Boliviana, realizando estudios sobre los metabolitos secundarios de las plantas hacia una terapéutica natural, basado en la medicina tradicional. El presente estudio corresponde a la evaluación del Aceite esencial, Acido Ursólico y sus dos modificaciones estructurales presentes en el *Clinopodium bolivianum*, los cuales no cuentan con estudios de actividad anti-*Helicobacter pylori*. **Resultados:** técnica difusión con disco se obtuvo los siguientes resultados el promedio de halo de inhibición del Aceite esencial es de 59.8 mm, del Acido Ursólico es de 31.6 mm y el Acido Ursólico Oxidado es de 45.1 mm indicando sensibilidad al *Helicobacter pylori*, comparando con el control positivo tetraciclina con un halo de 40.53 mm. La técnica de MIC presentó el siguiente resultado Aceite esencial presentó un MIC de 0.06 uL/mL, del Acido Ursólico y su oxidación ambos presentaron un MIC de 15 ug/mL indicando sensibilidad al *Helicobacter pylori*, comparando con el control positivo tetraciclina que presentó MIC de 30 mg/mL. **Conclusión:** Con los resultados obtenidos se puede señalar que el Aceite esencial, el Acido Ursólico y el Acido Ursólico oxidado provenientes del *Clinopodium bolivianum* (Khoa) presentan actividad anti-*Helicobacter pylori*.

**Palabras claves:** *Helicobacter pylori*, Aceite Esencial y Acido Ursólico.



## Abstract

**Introduction:** *Helicobacter pylori* are a bacterium that has a direct relationship to the development of gastroduodenal disease. It is estimated that over 50% of the world population is infected with this bacterium. The treatment used to eradicate the bacterium fails to more than 20%, particularly by the generation of commercial antibiotic resistance. **Justification:** *Helicobacter pylori* are a microaerophilic organism that colonizes and infects the human gastric mucosa. In the area IIFB, Faculty of Pharmaceutical and Biochemical Sciences carried out studies on Bolivian herbal plants, conducting studies on plant secondary metabolites towards natural therapeutics, based on traditional medicine. The present study is the evaluation of the essential oil, Ursolic acid and its two structural modifications present in the *Clinopodium bolivianum*, which no studies have anti-*Helicobacter pylori* activity. **Results:** disk diffusion technique the following results are the average zone of inhibition of essential oil is 59.8 mm, the Ursolic acid is 31.6 mm and Rusty Ursolic acid is 45.1 mm indicating susceptibility to *Helicobacter pylori*, compared with the tetracycline positive control with a halo of 40.53 mm. The MIC technique presented the following results essential oil presented a MIC of 0.06 uL / mL of Ursolic acid and its oxidation both had an MIC of 15 ug / mL indicating sensitivity to *Helicobacter pylori*, compared with the positive control tetracycline MIC present 30 mg / mL. **Conclusion:** From the results obtained it can be stated that the essential oil, Ursolic Acid and Ursolic Acid oxidized from the *Clinopodium bolivianum* (Khoa) have anti-*Helicobacter pylori* activity.

**Keywords:** *Helicobacter pylori*, Ursolic Acid and Essential Oil.

## 1. Introducción

Desde el descubrimiento de los investigadores australianos Warren y Marshall después de haber realizado cultivos de *Helicobacter pylori*, al principio de la década de los años 80, se llegaron a realizar numerosos estudios sobre la microbiología de esta interesante bacteria, la cual tenía una característica en particular. *Helicobacter pylori* es una bacteria Gram negativa microaerófila que infecta la mucosa gástrica humana y está asociado con el desarrollo de diversas enfermedades digestivas como ser: la gastritis, úlcera gastroduodenal, adenocarcinoma gástrico y con el desarrollo del linfoma gástrico de células B del tejido linfoide asociado a la mucosa "MALT" (Blaser 1997; Yacoob et al., 2008).

La infección con *Helicobacter pylori* ocurre en todo el mundo, pero la prevalencia entre países y grupos de población dentro del mismo país tiende al aumento de la diseminación de la bacteria. La prevalencia global de *Helicobacter pylori*, está fuertemente correlacionada con las condiciones socioeconómicas (Suerbaum & Michetti 2002). Las condiciones socioeconómicas que generan una diseminación de la enfermedad, por falta de higiene en la manipulación de alimentos. Existen tres vías de transmisión de la bacteria, la fecal-oral, oral-oral y gastro-oral. La transmisión fecal-oral, es la ingesta directa o indirecta de aguas contaminadas, la transmisión oral-oral a través de la placa dental, el aislamiento de la bacteria del jugo gástrico y vómitos de personas infectadas hace que la ruta gastro-oral sea una vía de transmisión (Ramírez,



Sánchez2009).La búsqueda de los factores causantes de las enfermedades gástricas se ha intensificado en los últimos años; señalándose entre ellos a la ureasa bacteriana, adhesinas, hemaglutininas y la producción de una toxina vacuolizante siendo estas las principales causas de la enfermedad (Rivas & Hernández 2000).La producción de ureasa y la motilidad por sus flagelos son esenciales para la primera etapa de la infección, de esa manera logra colonizar la mucosa gástrica persistentemente y ser una fuente de contaminación.

Más de 25 años después de haber aislado por primera vez esta bacteria, aún no se ha encontrado el tratamiento óptimo de erradicación del *Helicobacter pylori*; incluso las combinaciones más efectivas actualmente disponibles fracasan en aproximadamente un 20% de los casos (Gisbert 2011).Se ha observado que el 70 a 90% de los pacientes con úlcera gástrica o duodenal se encuentran infectados con *Helicobacter pylori* y que el tratamiento combinado utilizando antibióticos (amoxicilina y claritomicina) y un anti secretor (omeprazol) produce la erradicación del microorganismo en un 80-90% de los casos (Vu 2000).Los fracasos en la erradicación están relacionados a la falta de adherencia al tratamiento, la resistencia bacteriana y los efectos adversos de estos tratamientos (Francesco, Giorgio & Hassan 2010).

Estudios realizados en la ciudad de La Paz, Bolivia, demuestran que aproximadamente el 50% de la población presenta infección por *Helicobacter pylori* (Bilbao 2006).El uso de la quimioterapia para erradicar a *Helicobacter pylori* es bastante compleja, fastidiosa,

y costosa. Bolivia tiene elevados índices de pobreza, por lo que resulta costoso para algunas familias acceder al tratamiento. El aumento de la prevalencia de esta enfermedad en la población y la necesidad de disminuir los efectos que esta produce ha sido el estímulo de muchos científicos para el desarrollo de nuevas técnicas y medicamentos seguros para la población, estudiándose también alternativas naturales o derivados semisintéticos de productos naturales que ayuden a curar o prevenir el desarrollo de esta patología y sus efectos. Rescatando de esta manera los conocimientos de nuestras etnias y culturas, las mismas que sugieren terapias alternativas en base al uso de plantas medicinales. Algunos productos naturales han sido reportados como antiulcerogénicos en modelos de úlcera gástrica en animales (Lewis & Hanson 1991).

Trabajos anteriores, realizaron estudios sobre la actividad anti- *Helicobacter pylori* *in vitro* con el uso de plantas medicinales como ser: *Calendula officinalis* (Calendula), *Clinopodium bolivianum* (Khoa), *Piper elongatum* (Matico), *Plantago major* (Llantén), *Verbena officinalis* (Verbena) y *Rubus boliviensis* (Khari-khari). Se ha evidenciado que los extractos diclorometánico, hidroalcohólico y acuoso de *Clinopodium bolivianum*, y *Piper elongatum*, tienen actividad anti-*Helicobacter pylori* al igual que el extracto hidroalcohólico de *Plantago major* (Claros et al., 2007). Siendo de interés el estudio de los compuestos mayoritarios y las posibles modificaciones estructurales del *Clinopodium bolivianum*, especie vegetal estudiado con mayor frecuencia la cual se tiene reportes de la actividad anti- *Helicobacter pylori* de los extractos diclorometánico, hidroalcohólico y acuoso. La presencia de los aceites esenciales en esta especie en su

mayoría están compuestos por terpénicas y fenilpropánicas, almacenados en tejidos secretores de los órganos vegetales aromáticos. Estudios recientes muestran la actividad antibacteriana de diversos aceites esenciales, los cuales pueden contener más de 150 componentes (Fuertes & Murguía 2001).



### 1.1. Antecedentes

Hacia finales de los años 1970, Robín Warren, trabajando en el Royal Perth Hospital de Australia, observa la presencia de bacterias curvadas en las muestras de biopsias gástricas de enfermos con úlcera gastrointestinal, pero estas observaciones quedan sin el reconocimiento por parte del mundo científico hasta que Barry Marshall, unos años más tarde, realiza un período de rotación como médico por el laboratorio del Dr. Warren confirmando de esta manera la presencia de la bacteria (Taylor & Blaser 1991).

En los años de 1970 y 1983, miles de gastroenterólogos y patólogos de cerca inspeccionaron el estómago con endoscopia, biopsias e incluso microscopia electrónica y solo unos cuantos reconocieron al microorganismo de manera más precisa. En 1983 Marshall y Warren reportaron a la comunidad científica el hallazgo en el estómago de pacientes con gastritis y úlcera péptica de una bacteria espiralada Gram negativa a la que denominaron *Campylobacter like organism* (organismos tipo *Campylobacter*) y que hoy conocemos como *Helicobacter pylori* (Warren & Marshall 1983). En octubre de 1981, aún sin haber podido cultivar a la bacteria, tratan al primer paciente, un varón anciano de origen ruso con una intensa gastritis cuya biopsia mostraba innumerables organismos tipo *Campylobacter*. Le aplicaron tratamiento con tetraciclina, observando la mucosa gástrica enrojecida en la endoscopia de control, el componente inflamatorio agudo había mejorado en el estudio histológico y las bacterias habían desaparecido (Pajares & Gisbert

2006). Esta comunicación fue recibida con gran escepticismo pues hasta entonces se afirmaba que “en el estómago no podía sobrevivir ningún microorganismo, debido al pH gástrico ácido, existiendo solo la posibilidad de que hayan gérmenes de paso y que los microorganismos descritos por estos autores australianos se debían a contaminación” (Ramírez & Gilman 2004)

La importancia de *Helicobacter pylori* tal, que ya se conoce la secuencia de su genoma, también se han descrito sus factores de virulencia y se acepta su participación en la causalidad de gastritis, úlcera péptica, linfoma de MALT e incluso se asocia el desarrollo del cáncer gástrico (Atherton et al., 1997a). Gracias a los adelantos se pudo observar la secuencia de los datos para el genoma del *H. pylori* indicando el tiempo secuencial y la direccionalidad de los distintos tipos de migraciones humanas como ser la región del Pacífico, población donde el gen de *H. pylori* ha sido secuenciado y se ha utilizado para inferir la historia de las interacciones sociales en las poblaciones humanas (Gregory & Guttmacher 2011). Consensuaron que los regímenes de tratamiento debe ser simples, bien tolerados y lograr una tasa de erradicación más allá del 80%. Recomendaron que el tratamiento de erradicación debe ser con una triple terapia basada en un inhibidor de la bomba de protones (IBP) y dos de antiinflamatorios como ser: claritomicina, un nitroimidazol (metronidazol o tinidazol) y amoxicilina (Malfertheiner et al., 2007).

Engin Altintas y cols realizaron un estudio incluyendo 139 pacientes con alteraciones gastroduodenales (causadas por la presencia de *Helicobacter pylori*) diagnosticados por

histología y prueba de ureasa. Aplicaron el esquema recomendado por el Maastricht, pero utilizaron diferentes inhibidores de la bomba de protones teniendo bajos resultados, ante lo cual concluyeron que se debía a resistencia a antibióticos por la diferencia genética de la bacteria (Altintas et al., 2004).

Estudios sobre la actividad anti-*Helicobacter pylori* de plantas medicinales tanto *in vitro* como *in vivo* busca una terapia alternativa natural. Nuevos agentes anti-*Helicobacter pylori* se han encontrado en los productos naturales, donde se destaca a los polifenoles. La inhibición de enzimas como la ureasa, resulta ser una estrategia interesante mediante la cual los polifenoles pueden limitar la colonización por *Helicobacter pylori* (Chávez et al., 2011).

Las especies vegetativas se presentan como una fuente muy diversa para la obtención de principios activos con potencial bactericida, fungicida y plaguicida así como para el desarrollo de nuevas terapias diseñadas para el control de *Helicobacter pylori* (Castillo & Rivero 2007). Bolivia, es un país que posee una extensa flora medicinal utilizada por diversas etnias y culturas, para tratar distintas enfermedades. *Clinopodium bolivianum* (Khoa) es una planta nativa propia de Bolivia, usada popularmente para tratar problemas gastrointestinales (Carhuapoma 2007).



## 1.2. Planteamiento del problema.

En los últimos años hemos sido testigos de la progresiva disminución de la eficacia de los diferentes esquemas de tratamiento con tasas de erradicación que han descendido hasta valores inaceptables y fracaso terapéutico, por eso es necesario buscar alternativas de tratamiento para la erradicación de *Helicobacter pylori*, debiendo ser éstas de menor costo y que estén al alcance de todos los pacientes, lo cual traerá beneficios como la reducción en patologías asociadas a este como la úlcera péptica, carcinoma y linfoma gástrico; y mejorar la salud del paciente con desaparición de sintomatología, con lo cual disminuirá efectos secundarios del tratamiento.

*Helicobacter pylori* es un organismo microaerófilo que coloniza e infecta la mucosa gástrica humana. La infección está distribuida mundialmente y su incidencia varía según la región geográfica y de acuerdo a los niveles socioeconómicos de la población. Dada la prevalencia de la infección por dicha bacteria, es lógico pensar en los grandes esfuerzos que la comunidad científica está realizando para establecer un tratamiento eficaz.

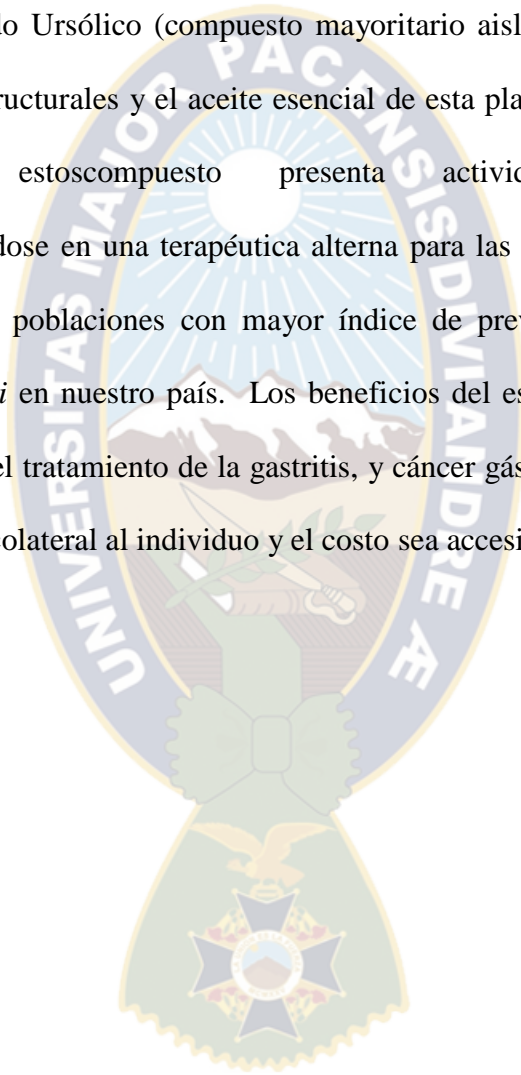
En el área de investigación de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas se lleva a cabo, diferentes estudios sobre las plantas de la herbolaria Boliviana realizando estudios sobre los metabolitos secundarios para obtener una terapéutica natural, basado en la medicina tradicional. En los últimos años el uso de la medicina tradicional se ha

convertido en una terapia alternativa de importancia en el tratamiento de enfermedades comunes del ser humano, sin embargo los conocimientos aportados por los médicos tradicionales y/o curanderos solo se basan en el conocimiento empírico del uso de las plantas medicinales usadas por generaciones, cuya dosificación proviene de la experimentación, por tal motivo, no siempre es posible que estos tratamientos cuenten con una base científica para probar su aplicación farmacológica y es necesario caracterizar los compuestos secundarios de las plantas medicinales para evaluar la concentración e identificar principios activos de cada planta y cuál es la que presenta actividad *anti-Helicobacter pylori*.

En estudios relacionados con este tema, se evaluó la actividad *anti-Helicobacter pylori* *in vitro* con el uso de plantas medicinales como ser: *Calendula officinalis*, *Clinopodium bolivianum*, *Piper elongatum*, *Plantago major*, *Verbena officinalis* y *Rubus boliviensis*. De las cuales se determinó que las especies de *Clinopodium bolivianum* y *Piper elongatum* en los extractos diclorometano, hidroalcohólico y acuoso, presentan actividad *anti-Helicobacter pylori*. En la misma línea de investigación se realizó un estudio de la “Evaluación de la actividad *anti-Helicobacter pylori* del *Clinopodium bolivianum*, y *Piper elongatum* mediante la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) por agar en dilución”. Se determinó que el extracto de *Clinopodium bolivianum* (Khoa) tiene actividad *anti-Helicobacter pylori* definida con un MIC de 64 ug/mL presentando solamente 6.06% de cepas resistentes.



La finalidad de este trabajo es la aplicación de nuestros recursos naturales, al campo médico, como una alternativa al tratamiento de *Helicobacter pylori*. La especie *Clinopodium bolivianum*, anteriormente mostro actividad. En este estudio se determinará al Acido Ursólico (compuesto mayoritario aislado en el IIFB-IIQ), sus dos modificaciones estructurales y el aceite esencial de esta planta. De esta manera se podrá identificar si este compuesto presenta actividad *anti- Helicobacter pylori*. Constituyéndose en una terapéutica alterna para las personas de bajo recursos ya que es una de las poblaciones con mayor índice de prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* en nuestro país. Los beneficios del estudio es el de poder obtener una alternativa en el tratamiento de la gastritis, y cáncer gástrico. En la cual sea eficaz, y no produzca daño colateral al individuo y el costo sea accesible para la población.



### 1.3. Objetivos.

#### 1.3.1. Objetivo general

- Evaluar la actividad anti-*Helicobacter pylori* del aceite esencial, Acido Ursólico y sus dos modificaciones estructurales extraídos del *Clinopodium bolivianum* (Khoa) mediante las técnicas de concentración mínima inhibitoria (CIM) por dilución en agar y difusión con disco.

#### 1.3.2. Objetivos específicos

- Obtener el aceite esencial del *Clinopodium bolivianum* (Khoa) por la técnica de arrastre de vapor.
- Evaluar la actividad anti-*Helicobacter pylori* del **Acido Ursólico y sus dos modificaciones estructurales del *Clinopodium bolivianum*** por la técnica de Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) dilución en agar.
- Determinar la actividad anti-*Helicobacter pylori* del **aceite esencial (monoterpenoides) del *Clinopodium bolivianum*** por la técnica de Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) dilución en agar.

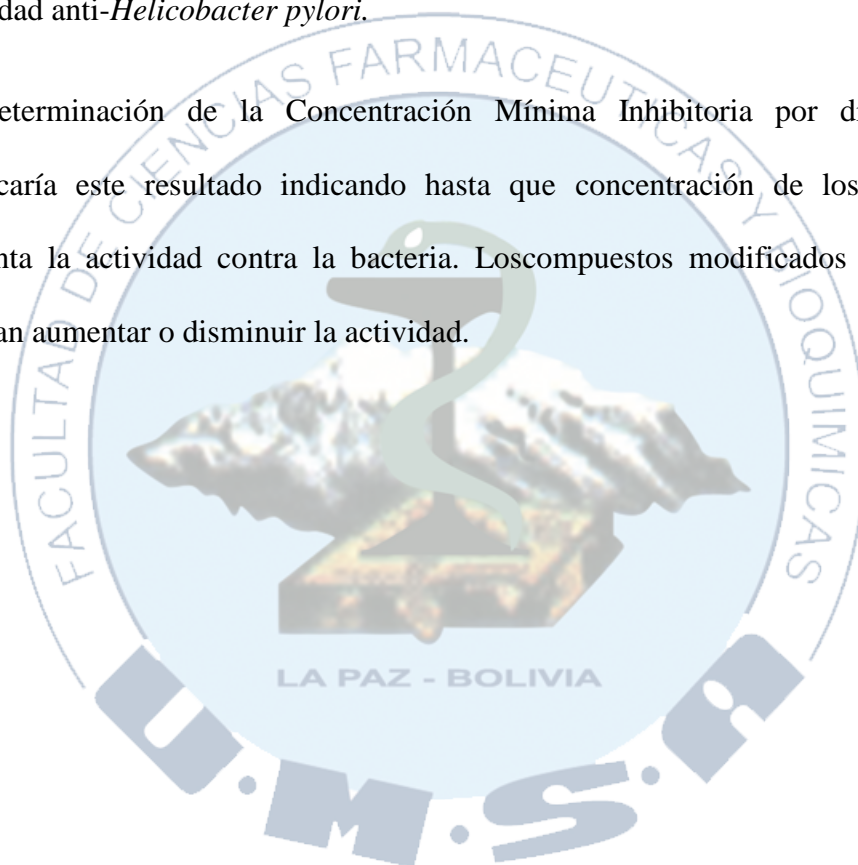
- Evaluar la actividad *anti-Helicobacter pylori* del **Acido Ursólico y sus dos modificaciones estructurales del *Clinopodium bolivianum* (Khoa)** por la técnica de difusión con disco.
- Determinar la actividad *anti-Helicobacter pylori* de los **aceites esenciales (monoterpenoides) del *Clinopodium bolivianum*** por la técnica de difusión con disco.



#### 1.4. Hipótesis

La técnica de impregnación con disco confirmará la actividad del aceite esencial y del compuesto Acido Ursólico ambos presentes en el *Clinopodium bolivianum* indicando actividad anti-*Helicobacter pylori*.

La determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria por dilución en agar verificaría este resultado indicando hasta que concentración de los compuestos se presenta la actividad contra la bacteria. Los compuestos modificados estructuralmente podrían aumentar o disminuir la actividad.



## 2. Marco teórico



Figura N°1: Planta *Clinopodium bolivianum*.

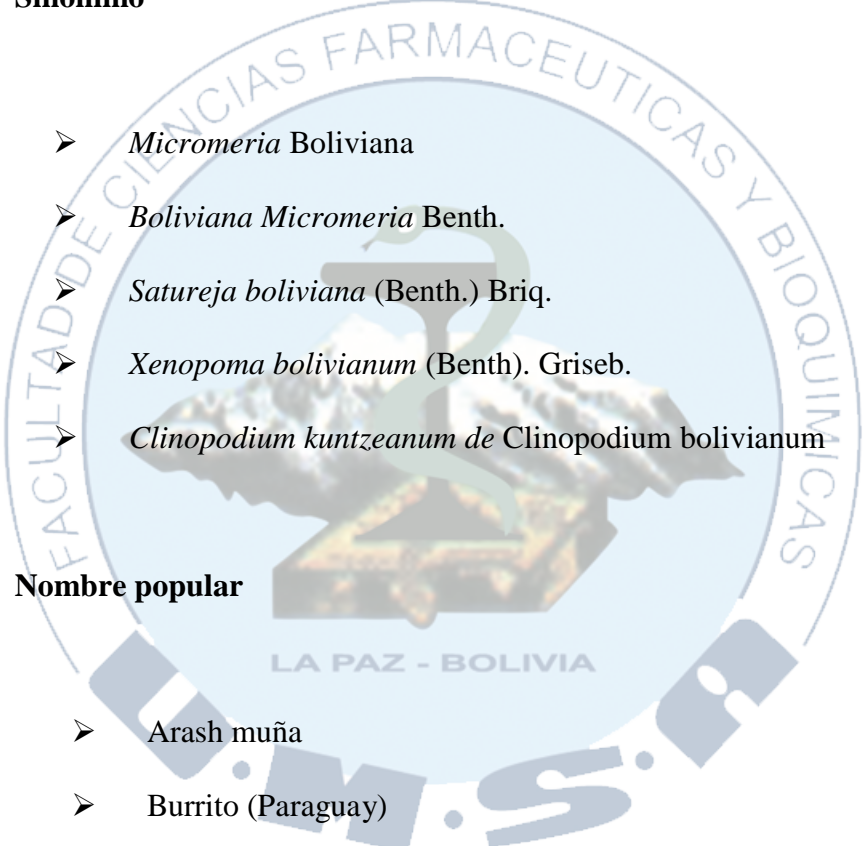
### 2.1. Descripción de la planta en estudio “*Clinopodium bolivianum*”

#### 2.1.1. Historia

El *Clinopodium bolivianum* (Khoa) describió por primera vez en el siglo XVII como “una planta semejante al orégano, pero de hojas menores y color verde más claro: de flores blancas parecidas a las de la col, pero menores y de muchas fragancias”. Los indígenas las usaban como resolutiva de tumores y sus hojas mezcladas con la de la chilca, en

fracturas de huesos. Se le usó también como febrífugo, antiinflamatorio y digestivo. Cobo en 1654, con respecto al aroma de la muña menciona: la muña es una planta que parece medio entre poleo (*Menta pulegium*) y orégano (*Oreganum vulgare*)

### 2.1.2. Sinónimo

- 
- *Micromeria Boliviana*
  - *Boliviana Micromeria Benth.*
  - *Satureja boliviana* (Benth.) Briq.
  - *Xenopoma bolivianum* (Benth). Griseb.
  - *Clinopodium kuntzeanum de Clinopodium bolivianum*

### 2.1.3. Nombre popular

- Arash muña
- Burrito (Paraguay)
- Coa
- Ismuña
- Martin muña (Bolivia)
- Muña muña
- Orcco muña
- Poleo silvestre

#### 2.1.4. Situación taxonómica

- Dominio: Eukaryota (Whittaker y Margulis, 1978)
- Reino: Plantae (Haeckel, 1866)
- Subreino: Viridaeplantae (Cavalier-Smith, 1981)
- Phylum: Traqueófitas ( Sinnott, 1935 ex Cavalier-Smith, 1998)
- Subphylum: Euphyllophytina (Cavalier-Smith, 1998)
- Infraphylum: Angiospermas
- Clase: Spermatopsida ( Brongniart, 1843)
- Subclase: Asteridae ( Takhtajan, 1967)
- Superorden: Lamiales ( Takhtajan, 1967)
- Orden: Lamiales (Bromhead de 1838)
- Familia: Labiadas ( AL de Jussieu, 1789)
- Subfamilia: Nepetoideae
- Tribu: Mentheae
- Subtribu: Menthinae
- Género: Clinopodium ( C. Linnaeus, 1753)
- Epíteto específico: bolivianum ( Kuntze)
- Nombre científico: - *Clinopodium bolivianum*(Kuntze)



### 2.1.5. Origen y distribución

Crece en el noroeste y centro de Argentina, extendiéndose hasta Bolivia y Perú (Cabrera 1983). Crece en los márgenes y resguardos de los arroyos que descienden de los cerros así como en las quebradas altas.

### 2.1.6. Descripción botánica

*Clinopodium bolivianum* es una planta herbácea aromática. Es un arbusto de hasta 1,5 m de altura (Figura N°2). Posee tallos ramosos, pubérbulos, con pubescencia más pronunciada en los nudos foliares y sus hojas presentan pecíolos glabros, de 1,5-4 mm de longitud, láminas de 0,5- 2,5 cm de longitud por 0,4-1 cm de ancho, lanceoladas, obtusas en el ápice y cuneadas en la base, de margen crenulado, glanduloso-punteadas, glabras o pubérbulas en ambas caras. Sus flores solitarias, axilares; caliz de 2,5-3,5 mm, infundiliforme, pubescente en la cara externa; corola blanca de 8,5-10 mm de longitud, glabrescentes en la cara interior; filamentos estaminales exentos, superiores de 4mm de longitud, inferiores de 6mm de longitud; estilo de 8-12 mm de longitud.



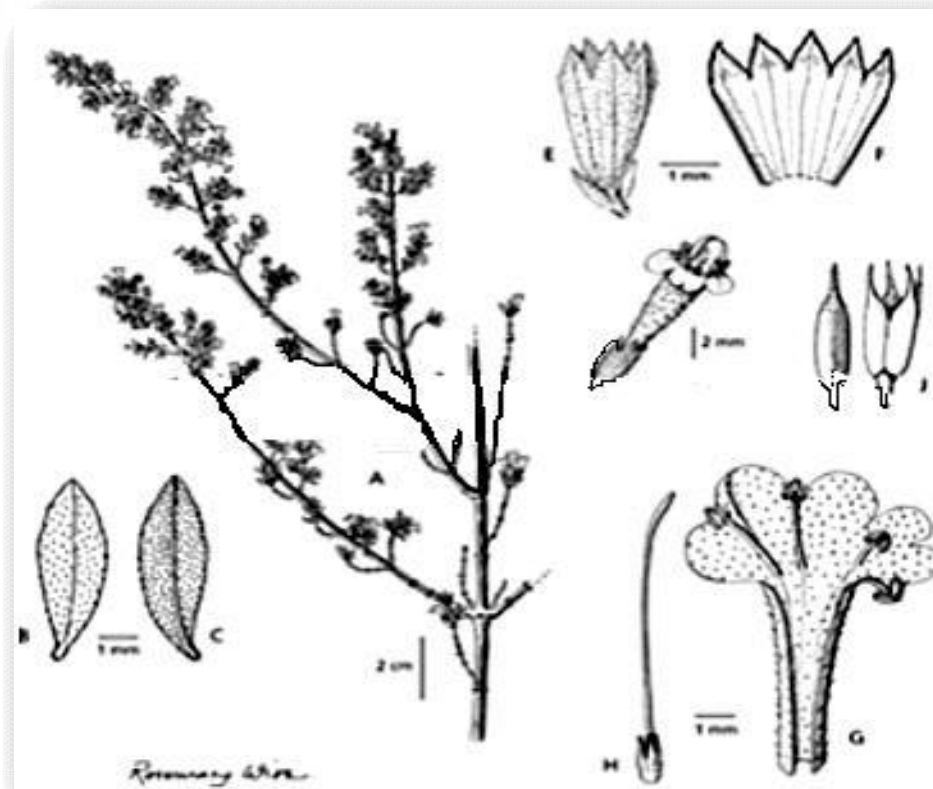


FIGURA N°2: Descripción botánica del *Clinopodium bolivianum*.

FUENTE: Recuperado de <http://www.springerimages.com>

### 2.1.7. Composición química

*Clinopodium bolivianum* está compuesto de esencias (mentol, geraniol, linalol, alcohol isoamílico, limoneno, cínelo), vitamina B1, calcio y fósforo (Claros et al., 2007). Existe también la presencia de flavonoides como ser: Apigenina, Acacetina, Luteolina, Diosmetina, Crisoeriol, Genkawanina, Cirsimaritina, Xantomicrol, Salvigenina, Gardenina B, 5-Desmetoxinobiletina, Apigenin-7-O-beta-glucósido, Apigenin-7-O-beta-

galactósido, Apigenin-7-O-beta-glucurónico, Luteolin-7-O-beta-rutinósido, Luteolin-7-O-beta-glucurónido, Quercetin-3-O-rutinósido, Naringenina, Neoponcirina, Eriodictiol, Taxifolina, Aurapina, Vitexina, Orientina (Gonzales 1998). Triterpénico pentacíclico como ser: Acido Ursólico y Aceite Esencial.

### 2.1.7.1. Acido Ursólico

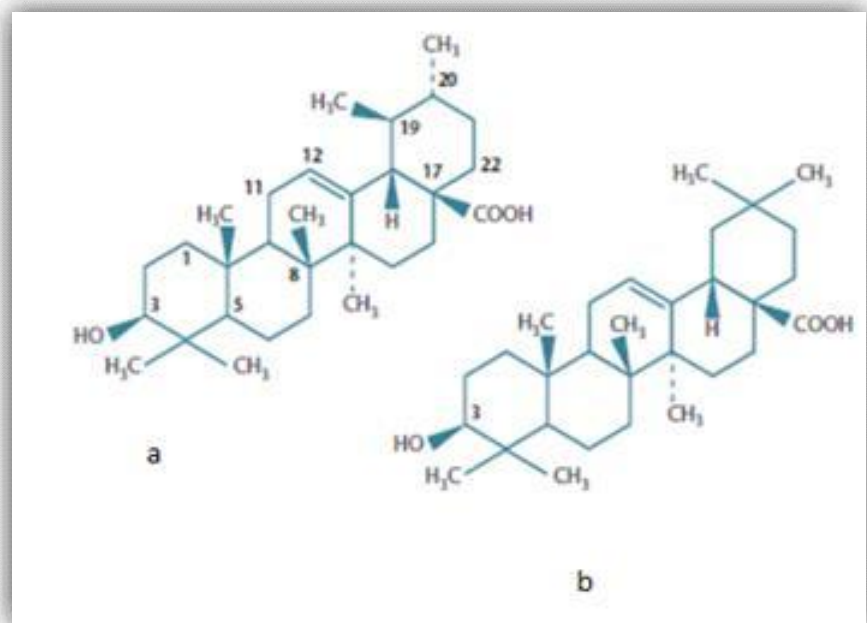


FIGURA N°3:a) Acido Ursólico y b) Acido Oleanolico.

FUENTE: Recuperado de **Formación Permanente En Dermofarmacia. VOL 23 NÚM 10 NOVIEMBRE 2004**

El ácido Ursólico es un compuesto triterpénico pentacíclico que está presente en numerosas especies vegetales, generalmente junto a su isómero, el ácido oleanólico (Figura N°3), fundamentalmente de la familia de las labiadas (Sattar et al., 1997).

También se ha aislado a partir de la cera protectora de diferentes frutas, tales como manzanas, peras, arándanos y ciruelas, así como de algas marinas.

En el año 2011 se llegó a aislar e identificar el Acido Ursólico (Acido 3 beta-hidroxiurs-12-en-28 oico) como producto mayoritario de la especie *Clinopodium bolivianum* identificado mediante los espectros de resonancia magnética unidimensional y bidimensional. A partir de ello se obtuvieron dos derivados Hemisintéticos del Acido Ursólico, el primer derivado se obtiene oxidando el acido Ursólico (Acido 3oxours-12en-28 oico) bajo condiciones controladas obteniéndose de este producto el 82% de rendimiento, posteriormente se obtuvo el segundo derivado del Acido Ursólico (Acido 3beta-acetours-12-en-28 oico) que es la acetilación obteniendo el 71 % de rendimiento del compuesto (Mamani, 2011).

#### **2.1.7.2. Aceite Esencial.**

El aceite esencial está compuesto por alfa-tujeno (1.35%); pineno (1.09 %); sabineno (2.92 %); 1-metil-2-(1 metil)-benceno (9.4 %); 1.8-cineol (9.02 %); isomentona (33.61 %); pulegona (9.97 %); carbacrol (11.14 %); cariofileno (1 %); epibencilosquifelandrino (0.97 %). (Figuroa *et al.*, 1997) La composición Fitoquímica de esta especie, según Zygadlo y colaboradores (1993). Se muestra en la tabla N° 1 según detalla Vila & Milo 1996

**Tabla 1:**Composición del Aceite Esencial de *Clinopodium bolivianum* (Vila & Milo 1996)

COMPUESTO	COMPUESTO	COMPUESTO	COMPUESTO
Alfa-tuyeno	p-cimeno	Beta-cariofileno	Acetato de timilo
Alfa-pineno	1-octen-3-il acetato	Mirtenal	Acetato de carvacrilo
Canfeno	3-octanol	Pulegona	Mircen-8-ol
Beta-pineno	1-octen-3-ol	Sigma-terpineol	Oxido de cariofileno
Sabineno	Beta-terpineol	Alfa-humuleno	(Z)-nerolidol
Mirceno	Mentona	Alfa-terpineol	(E)-nerodidol
Gama-3-careno	Mentofurano	Borneol	Beta-bourbonanol
Alfa-felandreno	Isomentona	Germacreno D	Espatulanol
Alfa-terpineno	Beta-dihidroumbelulona	Piperitona	T-cadinol
Limoneno	Beta-bourboneno	Biciclogemacreno	Acetato de linalol
1,8-cineol	Linalol	Sigma-cadineno	Isopiperitona
(Z)-2-hexenal	Hidrato de cis sabineno	Mirtenol	Acetato de geraniol
(Z)-beta-ocimeno	Isopulegona	Nerol	Aromadendreno
Gamma-terpineno	Terpinen-4-ol	geraniol	T-murolol

### 2.1.8. Usos tradicionales y prácticos.

**Bebidas:** Té, mate, Guarapos (Ven.), Licor (Arg.), Yerba compuesta (Arg.)

**Comida:** Dulces (Arg.), Condimento

**Medicinal:** Diarrea, cólicas, flatulencia, náusea, dolor de estomago en general, Resfriado, gripe, tos, bronquitis, asma, antiinflamatorio, carminativo, antiséptico, analgésico en afecciones renales y respiratorias. Sedativo, dolor de cabeza, aborto provocado, parto, afrodisíaco, impotencia, reumatismo.

**Bio-pesticida o repelente:** Se utiliza como pesticida, para conservar la papa, para lo cual se cubre con la planta y se controla la germinación y el ataque de las plagas. Almacenamiento de tubérculos (Perú, Bolivia), Infestaciones de pulgas, Parásitos de cultivos, Antimicótico, anti parasítico (Alexander & Schmidt 2009).

### 2.1.9. Acción farmacológica.

No existe mucha información sobre *Clinopodium bolivianum*, sin embargo se puede encontrar artículos con el nombre de *Satureja boliviana* como se la conoció hasta el año 2003. Se ha visto que presenta actividad antibiótica en pruebas in vitro contra diversas bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli* y *Salmonella enteritis*) y hongos (*Neurospora crassa*, *trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* y *Microsporum cannis*) con muy buenos resultados (Alonzo, 1998).

Gonzales E. estudio la actividad antiinflamatoria siguiendo el modelo de inducción de edema de pata por carragenina en ratones donde los extractos acuosos y etanólicos mostraron una interesante actividad en todas las fases del proceso encontrándose estos con buena o elevada actividad, con porcentajes de inhibición máximos de 55,6 % y 66,6 % respectivamente a las 5 horas de administración. Además estudio la actividad citoprotectora de mucosa gástrica mediante el modelo de inducción de úlcera gástrica por etanol en ratas dando como resultado el extracto acuoso 52.8 % y el extracto hexánico 25.7 % de actividad (Gonzales 1998).

En una tesis realizada en el IIFB por Figueroa con el Aceite Esencial del *Clinopodium bolivianum*, (*Satureja boliviana*) se evaluó la actividad antibacteriana, anti fúngica e insecticida, donde presentó actividad antibacteriana, anti fúngica, además tiene actividad insecticida porque actúa contra huevos y larvas de *Triatoma infestans* (vinchuca) (Figueroa et al., 1995)

**Tabla 2:**

Actividad Antibacteriana del *Clinopodium bolivianum* (Figueroa et al., 1995)

Halo de inhibición en mm

Gram positivo		Gran negativo		
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Shigella flexneri</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>
21	31	16	11	-



**Tabla 3:**

Actividad Anti fúngica del *Clinopodium bolivianum* (Figueroa et al., 1995)

<b>Hongos patógenos</b>		
<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Hepatozoon canis</i>
+	+	+

**Tabla 4:**

Actividad Insecticida del *Clinopodium bolivianum* (Figueroa et al., 1995)

<b><i>Triatoma infestans</i></b>		
<b>Huevos/larvas</b>	Larvas (4 <sup>o</sup> estadio)	<i>Aedes aegypti</i>
<b>Ovicida 10 a 20 %</b>	-	-
<b>Larvicida 3 a 20 %</b>	-	-

(-) indica ausencia de larvas y huevos; por tener actividad insecticida.

Estudios realizados con el ácido ursólico y el ácido oleanólico aislados de *Glechoma hederacea*, inhiben el crecimiento del tumor inducido por TPA (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate) sobre piel de ratón (Tokuda et al., 1986). Por este motivo, ambos compuestos se recomiendan en Japón para la prevención y para el tratamiento del cáncer de piel (Muto et al., 1990).

El Acido Ursólico presenta actividad antiinflamatoria, una acción habitual en los compuestos triterpénicos. El ácido ursólico inhibe las vías de la ciclooxigenasa, la 5-lipoxigenasa y la elastasa de los leucocitos humanos(Safayhi, Rall, Sailer y Ammon 1997). Por este motivo, el ácido ursólico es incluido en la formulación de cosméticos. También se reportó actividad antimicrobiana donde el ácido betaursólico inhibe el crecimiento de algunas variedades de *Staphilococcus*. Por esta razón, numerosas plantas de la familia de las labiadas que contienen ácido ursólico poseen propiedades antibacterianas y antifúngicas. Por ejemplo, la concentración inhibitoria mínima (CIM) de *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula officinalis* y *Origanum majorana* es de 500 y 250 µg/ml, respectivamente. El ácido ursólico también inhibe el crecimiento de *Microsporium lenosum* y *Candida albicans* a 250 µg/ml (Sattar et al., 1997).

En el Acido Ursólico aislado del *Clinopodium bolivianum* se realizó la evaluación de la actividad citotóxica en eritrocitos en sangre periférica humana, revela que el Acido Ursólico es medianamente tóxico y que el Acido Ursólico y sus derivados presentan actividad antiinflamatoria estadísticamente significativa  $p < 0,005$  (Mamani 2011).



## 2.2. Descripción de la bacteria en estudio:*Helicobacter pylori*.

### 2.2.1. Historia de la *Helicobacter pylori*.

La mayoría de las infecciones bacterianas del hombre se describieron a comienzos del siglo XX, por ello es extraordinario que el descubrimiento de *Helicobacter* como bacteria de gran importancia en medicina, se retrasara hasta los años ochenta. Cuando en el año 1981 Marshall y Warren inician un estudio prospectivo en pacientes que acuden a consulta para ser sometidos a endoscopia oral, seguramente no eran conscientes de la revolución que iban a originar en el mundo de la Medicina. Hasta entonces si a alguien se le hubiera ocurrido decir que las úlceras gastroduodenales podían ser curadas con tratamiento antibiótico, le habrían tachado de loco. En ese trabajo, realizado en el Royal Perth Hospital de Australia, 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 (Warren & Marshall 1983; Marshall et al., 1984).

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 estómagos de perros y gatos (Rappin 1881). Tras confirmar dichos hallazgos en animales, Salomón buscó las bacterias helicoidales en estómagos humanos donde también las observó (Salomón 1986).

Aunque fue Jaworski en 1899 fue el primero que sugirió un posible papel patógeno en la enfermedad gástrica, resulta curioso que, a pesar de que en 1906 Krienitz encontrara estos organismos en pacientes con cáncer gástrico sea difícil encontrar referencias bibliográficas hasta 1938, siendo un estudio que podría haber despertado una gran curiosidad científica al apoyar la hipótesis patógena. Ese año, Doenges en 1938 realiza el primer estudio sistemático en busca de las bacterias helicoidales en estómagos humanos.

Un año más tarde, Freedberg y Berron consiguen relacionar estos microorganismos con las úlceras gástricas, habiendo observado este tipo de bacterias helicoidales en un porcentaje similar de muestras que poseían patología gástrica (Freedberg & Baron, 1940). Esta controversia existente sobre la teoría infecciosa de la patología gastroduodenal pareció quedar supuestamente zanjada cuando en el año 1954 Palmer realiza un meticuloso estudio en más de 1100 biopsias gástricas y no encontró evidencia de bacterias espirales en ninguna de ellas (Palmer, 1954). Desde entonces quedó asumida la idea de que el estómago era un órgano estéril y que las bacterias vistas en biopsias eran fruto de la contaminación microbiana de la boca.

Tuvieron que pasar más de 20 años para que se volviera a sugerir la posibilidad de que la infiltración leucocitaria en la enfermedad ulcerosa se debía a una bacteria. Steer y Colin Jones en 1975, al estudiar muestras de pacientes con úlcera gástrica, observaron con microscopía electrónica la existencia de microorganismos espirales en la mucosa

gástrica asociados a respuesta inflamatoria (Steer & Czinn, 2005). Y es aquí donde volvemos a encontrarnos con Marshall, Warren y Goodwin, como se pudo comprobar, el hecho de observar bacterias curvadas en secciones histológicas de biopsias gástricas de enfermos de gastritis no era algo nuevo. Lo que sí marcaría un hito en la historia de la Microbiología es que por primera vez y tras varios intentos fallidos lograron cultivar la bacteria helicoidal de biopsias de antro gástrico siguiendo la metodología descrita por Skirrow para el aislamiento de *Campylobacter spp* (Skirrow, 1977). En vez de incubar las placas las 48 horas propuestas por Skirrow permanecieron siete días incubándose al coincidir con el periodo vacacional de Semana Santa. En un principio Marshall sugiere que podrían pertenecer al género *Spirillum* proponiendo posteriormente el nombre formal de *Campylobacter pyloridis* siendo revisado en 1987 para adaptarse a las formas gramaticales latinas correctas y apareciendo en las publicaciones científicas como *Campylobacter pylori* (Marshall & Goodwin, 1983).

Posteriormente estudios de secuenciación de la región 16S del RNA ribosómico demostraron que la especie denominada *Campylobacter pylori* era distinta de las especies de *Campylobacter* descritas hasta entonces. En 1989 se adoptó la nueva denominación de *Helicobacter*, pasando a denominarse *Helicobacter pylori* (Goodwin et al., 1989).

En España el primer trabajo donde se describe el aislamiento de *Helicobacter pylori* en pacientes con patología gastroduodenal se publicó en 1985 (López-Brea, et al.,

1985). Ese mismo año Marshall demuestra que dicho microorganismo cumple los postulados de Koch al ingerir el microorganismo induciéndose una gastritis hecho repetido por Morris en 1987. En el año 1995, la agencia internacional para la investigación del cáncer declaró al *Helicobacter pylori* como agente carcinógeno número uno para el adenocarcinoma gástrico.

En el año 2005 el jurado del Instituto Karolinska de Estocolmo Suecia, encargado de conceder el premio Nobel de Medicina, resalta la tenacidad de los científicos australianos Barry J. Marshall y J. Robin Warren a la hora de cuestionar los dogmas establecidos entorno a la gastritis y la úlcera del estómago o de duodeno. Ambos científicos demostraron que *Helicobacter pylori* era la causa de ambos trastornos. Estos hallazgos trascendentes en el mundo de la gastroenterología dieron como resultado el “Premio Nobel de Medicina 2005” a los australianos.

### **2.2.2. Clasificación taxonómica.**

Filogenéticamente el género *Helicobacter* pertenece a la clase Epsilonproteobacteria (Garrity et al., 2005). La especie tipo, *Helicobacter pylori*, fue inicialmente incluida en el género *Campylobacter*. Sin embargo, mediante el análisis de las secuencias 16S del ARNr se pudo comprobar la divergencia con otras especies de *Campylobacter*, y de este modo confirmar el hallazgo de un nuevo género bacteriano (Goodwin et al., 1989).

Los métodos genómicos analíticos, especialmente el análisis de secuencias de 16 s ribosomales de ácido ribonucleico (rRNA), demuestra que *Campylobacter* y *Helicobacter* son los miembros principales de un grupo distinto de bacterias (rRNA Superfamilia VI) que está relacionado lejanamente con otras eubacterias (Vandame et al 1991). Este grupo de bacterias tiene en común una serie de características: su forma espirilar-curvada, tener uno o más flagelos, microaerofilia, metabolismo asacarolítico y ecológicamente su adaptación para vivir en el moco (Megraud, 1994).

### 2.2.3. Especie del Género *Helicobacter*.

El género *Helicobacter* junto con *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Sulfurospirillum* y *Wollinella* forma parte de la clase *Epsilobacteria* en la subdivisión *Thiobacteria* de la división *Proteobacteria* (Cavalier-Smith, 2002). El género fue propuesto por primera vez en 1989 e incluyó a las especies *Helicobacter pylori* y *Helicobacter mustelae*, primeras bacterias aisladas de la mucosa gástrica humana y de los hurones, respectivamente (Goodwin et al., 1989). Diferentes especies del género *Helicobacter* se pueden encontrar en los humanos y otros mamíferos. Las especies del género *Helicobacter* se han dividido en las que colonizan en el estómago y las que se localizan en el intestino tanto de hombres como animales. En la tabla 5 se muestra las diferentes especies del género *Helicobacter* descritas hasta la actualidad (Skirrow, 1974; De Groot & Lee, 2000).



Tabla N°5

Diferentes especies del genero *Helicobacter*

Especies	Flagelos		Huésped habitual	Asociación
	Numero	Tipo <sup>a</sup>		
<b>Gástricas</b>				
<sup>b</sup> <i>H. pylori</i> (especie tipo)	4-8	Up/Bp	Hombre	Gastritis crónica activa; fuerte asociación con úlcera péptica y cáncer gástrico
<i>H. mustelae</i>	4-8	Bp,L	Hurones	No patología, a veces gastritis y ulceración
<i>H. nemestrinae</i>	4-8	Up/Bp	Macaco	No patología
<i>H. acinonyx</i>	4-8	Up/Bp	Leopardo	Gastritis
<i>H. felis</i>	14-20	Bp,F	Gato, perro	No patología/a veces gastritis
<i>H. bizzozeronii</i>	10-20	Bp	Perro	¿No patología?
<i>H. salomonis</i>	5-7	Bp	Perro	¿No patología?
<sup>b</sup> <i>H. heilmannii</i>	≥ 9	Bp	¿Gato y perro? Cerdo	Gastritis crónica activa (no común en hombre) ¿gastritis en gatos y perros?
<i>H. Candidatus bovis</i>			Ovejas, carneros	
<i>H. Suncus murinus</i>			Delfines	Gastritis y ulceraciones
<b>Intestinales</b>				
<sup>b</sup> <i>H. cinaedi</i>	1-2	Up/Bp	Hamster, perro gato, zorro	No patología en hamster; proctocolitis en hombres homosexuales
<sup>b</sup> <i>H. fennelliae</i>	1-2	Up/BP	?	Proctocolitis en hombres homosexuales.
<sup>b</sup> <i>H. canis</i>	2	Bp	Perro	¿Enteritis, hepatitis? Aislado de un niño
<sup>b</sup> <i>H. westmeadii</i>	1	Up	?	Bacteriemia en hombres con SIDA
<i>H. typhlonicus</i>			Ratones	
<sup>b</sup> <i>H. pullorum</i>	1	Up (noE)	Pollo	¿Hepatitis vibriónica?
<i>H. pametensis</i>	2	Bp	Gaviotas, cerdo	?
<i>H. cholecystus</i>	1	Up	Hamster	Colangiofibrosis, pancreatitis
<i>H. hepaticus</i>	2	Bp	Ratones	Hepatitis; coloniza en ciego et al. on
<i>H. bilis</i>	3-14	Bp,F	Ratones	Hepatitis; coloniza en ciego et al. on
<i>H. rodentium</i>	2	Bp (noE)	Ratones	?
<i>H. muridarum</i>	10-14	Bp,F	Roedores	No patología, puede colonizar en estómago y causar gastritis en roedores viejos
<i>H. trogonum</i>	5-7	Bp,F	Rata	No patología conocida
<sup>b</sup> <i>Flexispira rappini</i> <sup>a</sup>	10-20	Bp,F	Ovejas, ratones	Abortos ovinos; ha sido aislado de pacientes con diarrea crónica

<sup>a</sup> Up: unipolar, Bp: bipolar, L: lateral, F: fibrillas periplásmicas, (noE): no envainados<sup>b</sup> infecciones en el hombre

#### 2.2.4. Hábitat.

*Helicobacter pylori* es una bacteria que posee una capacidad única, la de poder persistir dentro del ambiente extremadamente ácido del estómago, una barrera efectiva para impedir la colonización gástrica por la mayoría de las especies bacterianas (Peek, 2003). Estos microorganismos se encuentran primordialmente libres en el moco gástrico, localizándose también en la superficie de las células epiteliales o en el intersticio celular. Predomina la localización antral y suelen alcanzar una densidad de 10<sup>6</sup> unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo de tejido (Cover, 1997a). Si bien la mucosa gástrica es su lugar de asentamiento habitual, también se han aislado de saliva, placa dental, heces, recto, sangre y secreciones respiratorias en caso de neumonía postaspiración (De Rafelet al., 1995).

*Helicobacter pylori* vive en la capa de moco que recubre al epitelio gástrico, un nicho ecológico con un pH ácido, un recambio celular elevado y un movimiento peristáltico continuo con una baja tensión de oxígeno (Cantón et al., 1995). Este microorganismo puede atravesar las uniones intercelulares, probablemente por la expresión de moléculas que ligan proteínas séricas y de la matriz extracelular del hospedador y se considera rara la invasión celular (Dubreuil et al., 2002).



### 2.2.5. Características generales y Morfología.

*Helicobacter pylori* es un bacilo gram negativo, curvado y microaerófilo que se encuentra en la mucosa gástrica del estómago humano. *Helicobacter pylori* tiene una morfología espiral en forma de sacacorchos cuando se encuentra en la mucosa gástrica y menos espiral cuando crece en medios artificiales Figura N°4, esta forma se puede perder en los cultivos más viejos o sometidos a situaciones no favorables para su crecimiento adoptando forma cocoide. Presenta un tamaño de 0,5 a 1,0 micras de ancho y de 3 micras de largo. Tiene de 2 a 6 flagelos monopolares, fundamentales para su movilidad, y que están recubiertos por una vaina de estructura lipídica, igual que la membrana externa, que parece tener la misión de proteger a los flagelos de su degradación del medio ácido (Amieva & El-Omar, 2008).



Figura N° 4: Característica morfológica del *Helicobacter pylori*

FUENTE: Recuperado de <http://bo.globedia.com>

### 2.2.6. Factores de patogenicidad que contribuye a la colonización.

*Helicobacter pylori* se adapta fuertemente al nicho ecológico de la mucosa gástrica, debido a sus características que le permiten entrar dentro del moco, nadar, atacar a las células epiteliales, evasión de la respuesta inmune y como resultado, la colonización y transmisión persistentes. La supervivencia del germen en la mucosa gástrica se lleva a cabo por una serie de mecanismos que incluyen: *adhesinas*, que le impiden ser arrastrado por el peristaltismo, la actividad ciliar o el recambio epitelial; enzimas bacterianas, como la *ureasa*, que transforma la urea en amonio, produciendo un microclima alcalino que lo protege de la acidez gástrica, *lipasa* y *proteasa* que propician la desintegración del moco gástrico y la pérdida de la hidrofobicidad de la mucosa disminuyendo la capacidad de las células mucosas para secretar moco, catalasa y superóxido dismutasa como línea de defensa ante polimorfonucleares activados (Alba et al., 2006).

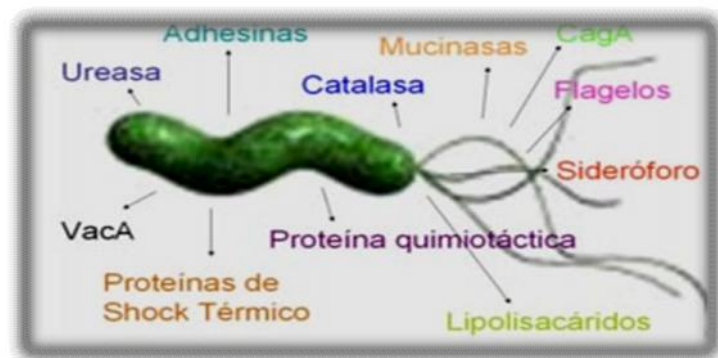


Figura N° 5: factores de patogenicidad de la *Helicobacter pylori*.

FUENTE: Recuperado de <http://vitae.ucv.ve>

*Helicobacter pylori* posee factores de virulencia que ayudan a la colonización del epitelio superficial, la profundidad de las criptas y el espacio entre las células epiteliales.

#### 2.2.6.1. Ureasa.

La ureasa es la enzima más abundante producida por *Helicobacter pylori* y su actividad depende del pH alrededor de la bacteria. El hábitat natural de *Helicobacter pylori* se encuentra por debajo de la capa mucosa, donde el pH se aproxima a la neutralidad (Bauerfeind et al., 1997). El mecanismo que utiliza para protegerse de ese pH ácido durante la colonización o de las bajadas de pH que pueden ocurrir por daños mecánicos en la mucosa, se basa en acumular una gran cantidad de ureasa en el citoplasma, en el espacio periplásmico y en la superficie de la bacteria. La ureasa es una metaloenzima que cataliza la hidrólisis de la urea presente en el estómago en amonio y dióxido de carbono. El amonio producido aumenta el pH, elevándolo hasta 6 ó 7 en su entorno. De este modo puede alcanzar la superficie de las células de la mucosa, donde el pH es prácticamente neutro. La ureasa se regula puesto que un aumento excesivo de la alcalinidad debida al  $\text{NH}_4^+$  producido mataría a la bacteria. La regulación se produce mediante un transportador dependiente de pH. El  $\text{NH}_4^+$  liberado va a producir una serie de daños que afectan a la microcirculación y a las células epiteliales superficiales. Origina una necrotización del tejido profundo; colabora en el desarrollo de gastritis atrófica crónica humana y facilita el incremento de infecciones virales y la carcinogénesis.

### 2.2.6.2. Sistemas antioxidantes

*Helicobacter pylori* es una bacteria microaerofílica vulnerable a la toxicidad de O<sub>2</sub>. Durante el proceso de colonización *Helicobacter pylori* promueve una fuerte respuesta inflamatoria mediada por neutrófilos y macrófagos, que generan una cantidad de metabolitos reactivos del oxígeno. *Helicobacter pylori* cuenta con mecanismos para la detoxificación de estos metabolitos, así como para la reparación de los daños sufridos que favorecen su supervivencia en el tejido inflamado. Entre los sistemas enzimáticos de detoxificación de los metabolitos reactivos del oxígeno están la enzima superóxido dismutasa, que cataliza la transformación del superóxido en peróxido de hidrogeno; la catalasa o peroxidasa, que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.

### 2.2.6.3. Flagelos

La gran movilidad de estas bacterias es fundamental para colonizar la mucosa gástrica, según se ha deducido de la infección experimental de animales con variantes de *Helicobacter pylori* aflageladas y por tanto no móviles. *Helicobacter pylori* posee alrededor de 2 a 6 flagelos monopares, característica inusual que es distinta del resto de proteínas flagelares, las cuales son homopoliméricas. Cada flagelo está compuesto por dos flagelinas, FlaA y FlaB. FlaB se localiza en la base del flagelo, mientras que la más abundante FlaA, se encuentra en el exterior. La eliminación de ambas flagelinas

dacomo resultado la pérdida de la movilidad, que sin embargo conservan una capacidad de adherencia similar a la de tipo silvestre. Además la morfología espiral o helicoidal facilita la movilidad en la viscosidad del moco gástrico, y la bacteria produce una proteasa que digiere el moco facilitando su avance.

#### 2.2.6.4. Adhesinas

Para la colonización de este microorganismo debe de haber primero una adhesión a la mucosa gástrica, la cual se inicia a través de varias adhesinas. Las adhesinas son proteínas glicoconjugadas o lípidos bacterianos involucrados en el inicio de la colonización. Una vez que *Helicobacter pylori* alcanza la capa epitelial, la bacteria se adhiere a través de varias adhesinas como BabA, SabA, AlpA, AlpB, Hopo, HpA. Estas adhesinas se unen a las células receptoras del huésped, estas son células epiteliales gástricas, a las que se une de una forma específica mediante un elevado número de adhesinas utilizando múltiples receptores. Entre ellos hay glicerofosfolípidos, sulfátidos, componentes de la matriz extracelular y secuencias repetidas de N-acetil-lactosamina o de glicoconjugados. Una sola clase de anticuerpos no inhibe por completo la adhesión de la bacteria a las células, por lo que se considera que la adherencia de *Helicobacter pylori* se realiza a través de múltiples adhesinas y receptores al mismo tiempo (Beswick et al., 2006).

### 2.2.7. Factor de virulencia

Son múltiples los factores que participan, produciendo inflamación gástrica, alteración de la producción de ácido gástrico y destrucción tisular Tabla N° 6.

**TABLA N°6**

Principales factores de virulencia.

<b>FACTORES DE VIRULENCIA</b>	<b>FUNCIÓN</b>
<b>Ureasa</b>	Neutraliza los ácidos gástricos; estimula la quimiotaxis de los monocitos y los neutrófilos; estimula la producción de citocinas inflamatorias.
<b>Proteínas de shock por calor (HspB)</b>	Aumenta la expresión de la Ureasa
<b>Proteínas de inhibición del ácido</b>	Induce hipoclorhidria durante la infección aguda al inhibir la secreción de HCl por parte de las células parietales.
<b>Flagelos</b>	Permite la penetración de la bacteria en la capa de la mucosa gástrica y de la protección del ambiente ácido.
<b>Adhesinas</b>	Interviene en la unión a las células huésped; entre ellas tenemos a las Hemaglutininas, la adhesina que se une al ácido siálico y la adhesina del grupo sanguíneo Lewis.
<b>Mucinasa</b>	Altera la mucosidad gástrica.
<b>Fosfolipasas</b>	Altera la mucosidad gástrica.
<b>Superóxido dismutasas</b>	Evita la fagocitosis al neutralizar los metabolitos del oxígeno.
<b>Catalasa</b>	Evita la actividad fagocítica al neutralizar los peróxidos.
<b>Citocinas de vacuolización</b>	Induce la vacuolización de las células epiteliales; estimula la migración de los neutrófilos en la mucosa.



### 2.2.8. Identificación bioquímica

*Helicobacter pylori* son quimioorganotrofas y tienen un metabolismo respiratorio. Son asacarolíticas (no hay fermentación ni oxidación de azúcares) aunque si ocurre la oxidación de glucosa. Tienen, al menos parcialmente, las vías metabólicas Entner-Doudoroff, de pentosas fosfato, y el ciclo de ácidos tricarbóxicos, pero la vía del glioxilato está ausente. No hidrolizan gelatina, almidón, caseína o tirosina, son rojo de metilo y Voges-Proskauer negativos. La actividad de oxidasa, ureasa y catalasa está presente en *Helicobacter pylori*, enzimas muy útiles para su identificación.

### 2.2.9. Fisiopatología de la *Helicobacter pylori*

#### 2.2.9.1. Colonización gástrica

*Helicobacter pylori* no posee capacidad invasiva pues no se observa en forma intracelular, sin embargo, es capaz de provocar daño epitelial debido fundamentalmente a su batería enzimática. La ureasa, una de sus principales enzimas, es imprescindible en el proceso de colonización de la mucosa gástrica; hidroliza la urea en amonio y CO<sub>2</sub>, esto proporciona un pH casi neutro a su alrededor, que le permite evadir las propiedades bactericidas del ácido clorhídrico (Tsuda, 1994). Las altas concentraciones de amonio alteran la biosíntesis del mucus gástrico, y recientemente se ha planteado que puede



proporcionar una energía adicional, la cual favorece la motilidad de los flagelos por la generación de un potencial de membrana (Meyer et al., 1996).

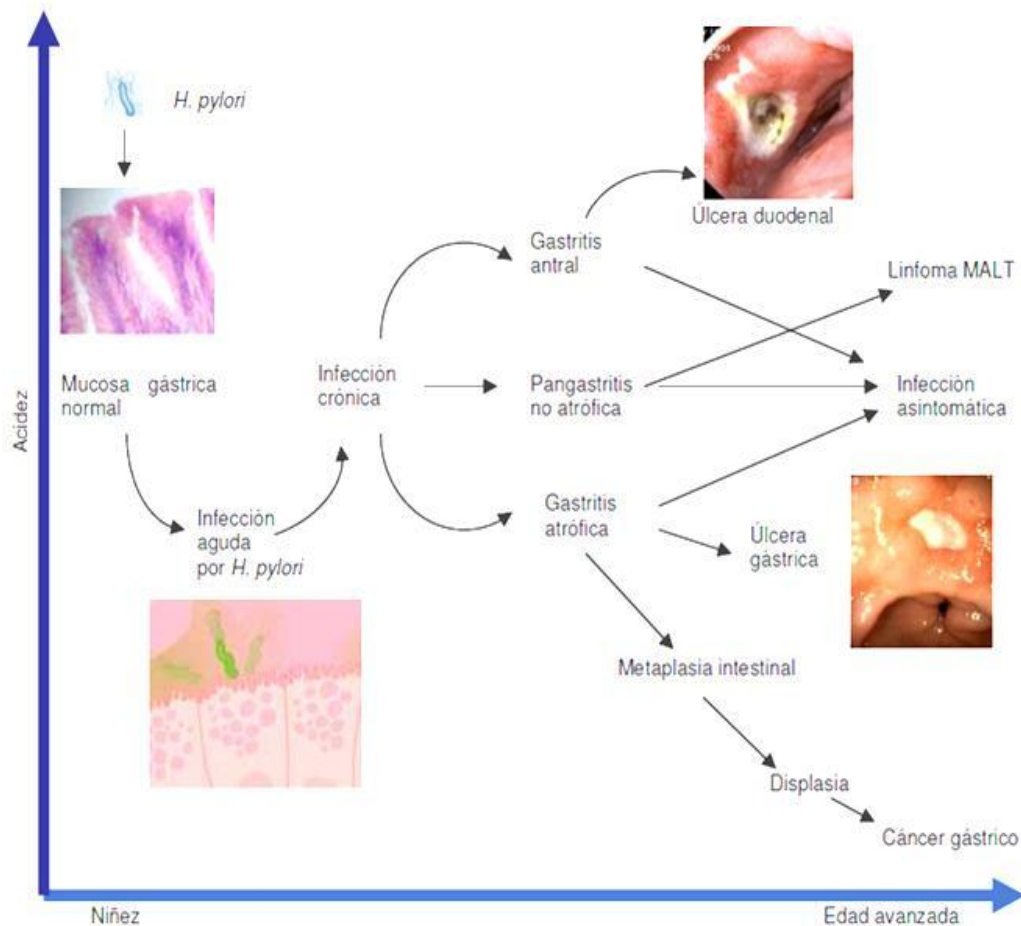
Unido a esto, las fosfolipasas hidrolizan las membranas celulares que liberan lisolecitinas, las cuales constituyen un factor ulcerogénico. Por su parte, los tetrapéptidos bacterianos ejercen un importante efecto quimiotáctico sobre eosinófilos y neutrófilos, lo cual facilita su reclutamiento y proliferación (Ibraghimov & Pappo, 2000; Hansen et al., 1999). Estas células al activarse provocan la liberación de citocinas, que posibilitan el desarrollo de una respuesta inflamatoria, la cual lesiona aún más la mucosa mediante la liberación de mediadores inflamatorios como los metabolitos del ácido araquidónico, los radicales libres del oxígeno, y los factores activadores de plaquetas, que junto con el microorganismo inducen la expresión de otros receptores para la liberación de interleucina 1, algunos factores de crecimiento celular y los radicales libres oxidantes (Rautelin et al., 1996; Suerbaum & Josenhans, 1999).

#### ***2.2.9.2. Patologías asociadas a la *Helicobacter pylori****

Cuando *Helicobacter pylori* coloniza la mucosa gástrica humana produce una gastritis superficial que puede permanecer así durante el resto de la vida o bien, al cabo de años o décadas desarrollar una úlcera péptica o una gastritis atrófica que podría ser el primer paso para la evolución a cáncer gástrico (Marshall et al., 1984). Todavía no se conoce

claramente por qué en unos pacientes la enfermedad es casi asintomática mientras que en otros se producen enfermedades digestivas de diferente gravedad.

Parece que algunos factores genéticos, ambientales o los factores de patogenicidad de la propia bacteria pueden tener su efecto en el desarrollo de la enfermedad. *Helicobacter pylori* está etiológicamente asociado a enfermedades gastro-duodenales, como se muestra en la Figura 6.



**Figura N°6: Patologías asociadas a la *Helicobacter pylori*.**

Recuperado: Innocenti, Svennerholm, & Quiding-Jarbrink, 20

➤ **Gastritis**

La gastritis es una enfermedad inflamatoria aguda o crónica de la mucosa gástrica producida por factores exógenos y endógenos que produce síntomas dispépticos atribuibles a la enfermedad y cuya existencia se sospecha clínicamente, se observa endoscópicamente y que requiere confirmación histológica (Figura 7).



**FIGURA 7:** Imagen endoscópica de gastritis crónica

**Recuperado:** Valdivia, 2011

La gastritis que se origina después de la infección por *Helicobacter pylori* puede desarrollarse sin manifestaciones o bien originar la expresión clínica propia de gastritis aguda (dolor epigástrico, náuseas y vómitos). La gastritis crónica se caracteriza por infiltración inflamatoria crónica, constituida por linfocitos y células plasmáticas, con

presencia de folículos linfoides y un grado variable de actividad. La gastritis crónica por *Helicobacter pylori* es un proceso dinámico que evoluciona hacia la atrofia que afecta al antro y se extiende en dirección al cuerpo (Suerbaum & Michetti, 2002).

La colonización permanente de la mucosa gastroduodenal por *Helicobacter pylori* va a causar una inflamación con un infiltrado mixto en el que predominan los leucocitos polimorfos nucleares, pero también con linfocitos y células plasmáticas, dando lugar a lo que se denomina gastritis crónica activa. Una de las características de este infiltrado en la edad pediátrica es la mayor presencia de linfocitos y células plasmáticas y una afectación más leve que la que tiene lugar en el adulto, por lo que se denomina gastritis crónica superficial activa. La bacteria puede ser identificada en biopsias gástricas mediante tinción de Giemsa y en presencia de mucha cantidad de bacterias incluso con hematoxilina-eosina. Después de la erradicación del microorganismo, la gastritis histológica mejora lentamente pero no desaparece totalmente hasta seis meses o un año después de la finalización del tratamiento.

La sintomatología asociada a la gastritis por *Helicobacter pylori* es muy variable. Puede expresarse con un cuadro compatible con lo que se llama dispepsia no ulcerosa, que se interpreta con síntomas como dolor en epigastrio o hemiabdomen superior, sensación de plenitud, náuseas y vómitos (Di Lorenzo, 2005).

➤ **Úlcera gástrica**

La asociación de *Helicobacter pylori* con la úlcera duodenal es clara, ya que un 90 – 95% de los pacientes presentan el microorganismo y se curan en su gran mayoría al erradicar la bacteria. Con respecto a la úlcera gástrica, también existe una clara relación, aunque sólo un 70% de este tipo de úlceras está asociada a la presencia de *Helicobacter pylori*, el resto se asocian al consumo de antiinflamatorios no esteroideos. La úlcera gástrica o duodenal relacionada con la infección por *Helicobacter pylori* es muy poco frecuente en la edad pediátrica respecto a lo que ocurre en el adulto.

➤ **Cáncer gástrico**

La infección por *Helicobacter pylori* origina una gastritis superficial y si se vuelve mas cronico puede aparecer atrofia, que es una condición pre-cancerosa. En 1994 la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer de la Organización Mundial de la Salud incluyó a *Helicobacter pylori* como agente biológico carcinogénico para el hombre (categoría 1) basándose en evidencias epidemiológicas que le asocian con cáncer gástrico (Trajkow et al., 2007).

➤ **Linfoma gástrico tipo MALT**

El 90% de los pacientes con linfoma MALT son positivos para *Helicobacter pylori*. Este tipo de linfoma se localiza preferentemente en el antro del estómago, dado que es la zona donde existe más tejido linfoide. Además, varios estudios apoyan la asociación de

*Helicobacter pylori* con esta enfermedad puesto que tras la erradicación de la bacteria se ha observado la regresión del linfoma de bajo grado (Toshiro et al., 2004).

➤ **Manifestaciones extra digestivas**

Muchas publicaciones han relacionado la infección por *Helicobacter pylori* con una variedad de manifestaciones clínicas extra-digestivas (síndrome de muerte súbita del lactante, enfermedad coronaria, colangitis esclerosante primaria) sin que se haya podido demostrar la causa. Sin embargo si se han demostrado diferentes grados de evidencia que sustentan la relación de la infección por *Helicobacter pylori*, como:

- **anemia ferropénica refractaria:** diversos trabajos han demostrado una asociación entre la infección por *Helicobacter pylori* y la anemia ferropénica refractaria, en especial en pacientes pediátricos por poseer unos depósitos de hierro bajos (Yokota et al., 2008). No está claro si se trata de un incremento en las pérdidas de hierro o de una disminución de la absorción, pero lo que si es cierto es que la erradicación del germen permite la normalización de las cifras de sideremia y de los valores de ferritina en determinados pacientes con anemia ferropénica refractaria portadores de una gastritis por *Helicobacter pylori*.

Hay diferentes hipótesis para explicar la asociación de *Helicobacter pylori* con la anemia. La anemia podría estar en relación con pérdidas microscópicas



de sangre debidas a la gastritis crónica superficial activa o a una absorción duodenal de hierro disminuida que podría explicar el menor aporte de hierro y por tanto, una mayor demanda del mismo. La hipo acidez secundaria a la gastritis y el bajo nivel de ácido ascórbico en el estómago de estos niños sería la causa de la disminución de la absorción. Otra posible explicación podría ser el incremento del secuestro del hierro por la lactoferrina (proteína ligadora de hierro) cuyos niveles en la mucosa gástrica de los pacientes infectados por *Helicobacter pylori* están elevados.

Dado que *Helicobacter pylori* posee múltiples sistemas de adquisición de hierro, que le permite tomarlo del hierro disponible en el microambiente de la luz gástrica, otra de las teorías de la ferropenia es la propia competencia por el hierro entre la bacteria y el huésped infectado.

- **Púrpura trombocitopénica idiopática:** recientemente se ha observado que algunos pacientes con púrpura trombocitopénica idiopática crónica han respondido a la erradicación de *Helicobacter pylori* con un incremento del número de plaquetas (Emilia, 2007).

La explicación biológica de esta posible asociación es la similitud de los anticuerpos plaquetarios del suero con la citocina asociada al gen *cagA* del *Helicobacter pylori*.



### 2.2.10. Técnicas para el diagnóstico del *Helicobacter pylori*.

La infección por *Helicobacter pylori* puede diagnosticarse mediante métodos invasivos (que requieren la realización de endoscopia con toma de biopsia gástrica) o no invasivos (métodos para los que no se requiere realización de endoscopia). 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 et al., 2004; Steven et al., 2005).

#### 2.2.10.1. Métodos invasivos

La endoscopia con toma de biopsia para el estudio histológico permitirá no sólo diagnosticar la infección mediante el cultivo de dicha biopsia, sino que también el cultivo es imprescindible para poder conocer la sensibilidad a los antimicrobianos, con el fin de aplicar el tratamiento más efectivo en cada paciente y para conocer los porcentajes de sensibilidad en cada población.

- **HISTOLOGÍA:** el estudio histológico de la biopsia permite conocer las lesiones de la mucosa además de detectar la infección por *Helicobacter pylori*. La confirmación histológica de la inflamación de la mucosa es fundamental para el diagnóstico de la gastritis y su clasificación. Además permite detectar zonas de

metaplasia intestinal. La técnica de tinción es fácil, rápida, de bajo coste y de alta utilidad. Se han utilizado diferentes tinciones como la de Gram, Giemsa, Carbofuchina, Genta o tinciones inmunohistoquímicas. La visión microscópica tiene una sensibilidad y especificidad menor que la del cultivo.

- **UREASA:** la prueba de la ureasa permite detectar la presencia de la descomposición de la urea en anhídrido carbónico y amoníaco, que se demuestra mediante un cambio de color en el medio que contiene un indicador de pH. La prueba de la ureasa rápida se puede realizar directamente con la muestra de biopsia gástrica. Existen diferentes reactivos comerciales que contienen urea a diferentes concentraciones y un indicador de pH. Los resultados de sensibilidad y especificidad son en general superiores al 80% y 90%. La seguridad diagnóstica de la prueba dependerá de la localización de la biopsia utilizada, de la carga bacteriana y del tratamiento previo con antibióticos o con inhibidores de la bomba de protones.
- **PCR:** 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. En los últimos años se han desarrollado numerosas técnicas que permiten detectar la presencia del

DNA de *Helicobacter pylori* directamente de la biopsia gástrica pero también de otras muestras como heces, saliva o agua (Simala-Grant & Taylor, 2004).

➤ **CULTIVO:** *Helicobacter pylori* es un microorganismo capaz de crecer en distintos medios de cultivo si bien requiere diferentes factores de crecimiento. Los medios de cultivo sólidos más frecuentes son Agar Mueller-Hinton y Agar Columbia y los suplementos más comúnmente empleados son la sangre o derivados de ella. 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 & Lehours, 2007).

Para el aislamiento primario, con el objetivo de evitar el sobre crecimiento de contaminantes que pueden acompañar a *Helicobacter pylori* en la biopsia es necesaria la utilización de inhibidores que no afecten su viabilidad. Es recomendable añadir mezclas de antibióticos como el suplemento de Dent, que contiene vancomicina, trimetoprim, cefsoludina y anfotericina B. *Helicobacter pylori* es un microorganismo microaerofílico que requiere para su crecimiento una atmósfera con las siguientes características: 5-10% de O<sub>2</sub>, 5-10% de CO<sub>2</sub> y 80-90% de N<sub>2</sub> a 35-37°C, una humedad del 90-95% y una incubación de hasta 10 días antes de considerar negativo el cultivo.

- **Criterios de incubación:** Su temperatura óptima de crecimiento se produce a 37 °C, aunque puede desarrollarse en un rango de 35 a 39 °C en microaerofilia, y para su cultivo se requieren medios suplementados con suero o sangre entre el 5% y 10%, los cuales pueden actuar como fuentes adicionales de nutrientes y la protegen de efectos tóxicos de los ácidos grasos de cadena larga. El efecto de estos ácidos grasos también puede ser evitado por la adición de suplementos como  $\alpha$ -ciclodextrinas, IsoVitaleX o por la adición de carbón activado en el medio de cultivo (Mégraud, 1995).
- **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 sustratos que utilizan (Pitt, 2000).
  - Oxidasa: La citocromo oxidasa también conocida como oxidasa, es una enzima que se encuentra presente en algunas bacterias que

transfieren electrones al oxígeno, el aceptor final de electrones en la cadena de transporte de electrones, por lo que no se encuentra presente en anaerobios estrictos. La enzima citocromo oxidasa oxida el citocromo para hacer esta transferencia de energía. La presencia de esta enzima puede detectarse con el uso de discos comerciales para la prueba de oxidasa que actúan como donadores de electrones para la citocromo oxidasa, lo que genera que el disco se coloree púrpura, indicando una prueba positiva (Steel, 1961.).

o Catalasa: La catalasa es una enzima que se encuentra en la mayoría de las bacterias aeróbicas y anaeróbicas facultativas, pero no se encuentra presente en los anaerobios. La catalasa cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Es importante no contaminar la colonia de la bacteria a probar con agar sangre, ya que los glóbulos rojos tienen catalasa, lo que puede dar resultados falsos positivos. El ensayo no debe realizarse en cultivos viejos ya que pueden haber perdido su actividad de catalasa, dando falsos negativos. La prueba consiste en colocar unas cuantas bacterias en un portaobjetos, agregarle una gota de  $H_2O_2$  al 3% y se observa la liberación de burbujas de oxígeno (Vincent et al., 2003).

o Ureasa: La ureasa es una enzima que hidroliza a la urea transformándola en amonio y bicarbonato. La presencia de la ureasa puede detectarse colocando la bacteria en una solución de rojo fenol

con urea, se libera amonio y cambia el pH del medio, haciéndose más básico y el color de la solución cambia de amarillo a rojo (Bannerman, 2003).

#### **2.2.10.2. Métodos no invasivos**

El método ideal para diagnosticar la infección sería uno no invasivo o mínimamente invasivo, capaz de diferenciar infección activa de infección pasada. Los métodos desarrollados hasta ahora pueden tener utilidad en determinadas circunstancias, como la evaluación del seguimiento del tratamiento o estudios epidemiológicos.

- **SEROLOGÍA:** los métodos serológicos se basan en la detección de anticuerpos específicos frente a *Helicobacter pylori* en suero. La serología es útil en los estudios de poblaciones seleccionadas, sin embargo, su principal problema radica en que no puede diferenciar la infección activa de la exposición previa al microorganismo. *Helicobacter 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.
  
- **TEST DE SANGRE COMPLETA:** es un inmunoensayo indirecto realizado en fase sólida. Se detectan anticuerpos IgG frente a *Helicobacter pylori* presentes en



la sangre. En la misma consulta se puede obtener una gota de sangre del paciente. Se ha visto que al aumentar el tiempo de lectura 10 minutos a 6 horas aumenta la sensibilidad de la prueba. Este test no se recomienda actualmente.

- **DETECCIÓN DE ANTICUERPOS EN ORINA:** es una inmunocromatografía en fase sólida que también detecta IgG frente a *Helicobacter pylori*.
- **DETECCIÓN DE ANTICUERPOS EN SALIVA:** aunque debido a la comodidad de la obtención de la muestra se ha esperado mucho de esta técnica, los datos de sensibilidad obtenidos, que rondan el 80 %, no permiten ser optimistas respecto a su implantación.
- **PRUEBA DEL ALIENTO (Urea Breath Test: UBT):** es el método indirecto para detectar la ureasa de *Helicobacter pylori*. Si *Helicobacter pylori* se encuentra en el estómago va a hidrolizar la urea ingerida previamente y se va a liberar CO<sub>2</sub> marcado que se absorbe, difunde a sangre, es transportado a los pulmones y es liberado con el aliento. Se considera uno de los métodos no invasivos más seguros para detectar *Helicobacter pylori*. 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.



- **ANTÍGENO EN HECES:** es un método directo no invasivo que permite la detección de antígeno de *Helicobacter pylori* en muestras de heces. Existen varios sistemas comerciales que permiten detectar la presencia de antígeno en heces con anticuerpos policlonales o monoclonales. Pueden existir pequeñas diferencias entre ellos, habiéndose obtenido mejores resultados con los anticuerpos monoclonales. Se trata de un ensayo cualitativo. Es muy útil para niños pequeños (Andrews et al., 2001).

#### 2.2.11. Tratamiento para *Helicobacter pylori*

En una infección crónica con *Helicobacter pylori*, la bacteria no puede ser eliminada por el sistema inmune del hospedero, por lo que, para erradicar la infección, se requiere del uso de antibióticos (Hildebrand et al., 2001); desafortunadamente no existe un tratamiento ideal y la elección del mismo debe hacerse con base en los patrones de susceptibilidad locales (De Boer, & Tytgat, 2000). El tratamiento para la infección por *Helicobacter pylori* debe aplicarse después del diagnóstico clínico. El éxito en la erradicación de la infección depende de varios factores, entre los más importantes se consideran: la susceptibilidad de las cepas a los antibióticos utilizados y que el tratamiento se complete adecuadamente por los pacientes (Graham et al., 1992). Los antimicrobianos pueden actuar tópicamente contra *Helicobacter pylori* o sistémicamente (Goddard, 1998).

Se han propuesto diferentes pautas de tratamiento. En 1994 el Instituto Nacional de Salud (NIH) en los Estados Unidos de Norteamérica organizó la primera reunión de consenso sobre *Helicobacter pylori* y la úlcera péptica, donde se concluyó que los pacientes con úlcera péptica deberán curarse de la infección con una droga anti-secretora combinada con antibióticos anti *Helicobacter pylori* (1994. NIH Consensus Conference). El grupo Europeo de estudio sobre *Helicobacter pylori* organizó una reunión en Maastricht con expertos microbiólogos, médicos generales y gastroenterólogos, para establecer normas en el manejo de la infección por *Helicobacter pylori*. Los lineamientos del Maastricht recomiendan la terapia de erradicación en pacientes positivos a la infección por *Helicobacter pylori* con úlcera duodenal o gástrica, linfoma asociado a la mucosa gástrica (MALT) de bajo grado, gastritis con severos cambios macro o microscópicos y después de una resección de cáncer gástrico temprano.

El tratamiento para la erradicación debe tener una tasa de erradicación superior al 90%, utilizando una terapia triple con un inhibidor de la bomba de protones (IBP) claritromicina, metronidazol o tinidazol y amoxicilina durante una semana, lo que corresponde con los lineamientos establecidos en 1997 en Maastricht. La terapia de primera línea es la combinación de un IBP como omeprazol o lansoprazol o antagonistas de los receptores tipo 2 de la histamina como ranitidina-citrato bismuto (RBC) y claritromicina más amoxicilina o metronidazol, dos veces al día. La segunda línea de tratamiento es una terapia cuádruple con IBP o RBC dos veces al día, bismuto y tetraciclina cuatro veces al día y metronidazol tres veces al día. Ambas terapias deben

seguirse por un mínimo de siete días (Horn, 2000). La supresión ácida por antagonistas de los receptores tipo 2 de la histamina o inhibidores de la bomba de protones, ayudan en el alivio de los síntomas asociados a la úlcera (dolor abdominal, náuseas, etc.), ayudan a contrarrestar la inflamación de la mucosa y pueden aumentar la eficacia de los antibióticos frente a *Helicobacter pylori* en la superficie de la mucosa gástrica (Horn, 2000). Se ha observado que la erradicación de la infección cura la úlcera y surecurrencia (Hentschel et al., 1993). Después del tratamiento se deben realizar pruebas no invasivas, para confirmar que la infección ha sido erradicada (Kearney, 2003). La prueba debe llevarse a cabo al menos 4 semanas después de concluir el tratamiento. Los tratamientos para la erradicación de la *Helicobacter pylori* se detallan en la tabla 7.

**Tabla 7.**

Tratamientos para la erradicación de la infección por *H. pylori*.

TRATAMIENTO
<b>1. TERAPIA CON TRES MEDICAMENTOS</b>
Claritromicina + Amoxicilina o Metronidazol + IBP
Claritromicina o Metronidazol + Amoxicilina o Tetraciclina + IBP
Claritromicina o Metronidazol + Amoxicilina o Tetraciclina + ARH <sub>2</sub>
Metronidazol + Tetraciclina o Amoxicilina + Bismuto
<b>2. TERAPIA CON CUATRO MEDICAMENTOS</b>
Metronidazol + Tetraciclina o Amoxicilina + Bismuto + IBP
Metronidazol + Tetraciclina o Amoxicilina + Bismuto + ARH <sub>2</sub>
Metronidazol + Claritromicina o Amoxicilina + IBP + ARH <sub>2</sub>
Amoxicilina + Claritromicina + IBP + ARH <sub>2</sub>
<b>3. TERAPIA CON CINCO MEDICAMENTOS</b>
Metronidazol + Tetraciclina o Amoxicilina + Bismuto + ARH <sub>2</sub> + IBP
IBP: Inhibidor de la bomba de protones. ARH <sub>2</sub> : Antagonista de los receptores tipo 2 de la histamina.

### 2.2.11.1. Causas de fracaso del tratamiento.

En el fracaso del tratamiento pueden intervenir factores relacionados con el mismo tratamiento (dosis inadecuadas, una duración incorrecta del tratamiento, el tipo y la dosis del inhibidor de la bomba de protones), factores del paciente (falta de adherencia al tratamiento) o factores de las cepas (Graham & Shiotani, 2008). Entre los factores del microorganismo es muy importante la resistencia a los antibióticos y quizá las características particulares de la cepa (Alarcón, Domingo & López-Brea, 1999).

#### **2.2.11.2. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana**

La resistencia a antimicrobianos se puede detectar mediante diferentes métodos que se pueden clasificar en fenotípicos y genotípicos. Los métodos fenotípicos están basados en la apariencia macroscópica tras cultivo de la bacteria y los métodos genotípicos en la detección de los genes y las mutaciones implicadas en la resistencia. (Mégraud & Lehours, 2007)

##### **➤ Dilución en agar**

Es el método fenotípico de referencia, pero poco útil para realizar de forma rutinaria, aunque válido para confirmar los resultados obtenidos por otros métodos y realizar estudios para conocer la tasa global de resistencia en un área determinada. El método de dilución en caldo es útil para otras bacterias pero no para *Helicobacter pylori* ya que se contamina con facilidad.

➤ **Método de Espilómetro(E-TEST)**

Es un método cuantitativo para realizar las pruebas de sensibilidad *in vitro* basado en la difusión. El método del espilómetro está especialmente recomendado en organismos fastidiosos y cuando se deben probar pocos microorganismos o pocos antibióticos y tiene diferentes ventajas sobre los métodos tradicionales de dilución en agar o difusión en agar.

➤ **Difusión en disco**

Es el método fenotípico más fácil y barato para determinar la sensibilidad *in vitro*, pero los resultados que se obtienen no siempre se correlacionan con los obtenidos por el método de dilución en agar, aunque algunos autores sí observan buena correlación y lo recomiendan como práctico, seguro y con aplicación para predecir los resultados clínicos (McNulty et al., 2002).

**3. Diseño metodológico:**

### 3.1. Equipos

- Arrastre de vapor
- Autoclave “Modelo 25X-2”.
- Balanza analítica “AND”.
- Baño maría.
- Campana de flujo laminar.
- Estufa para cultivo “San Jor analógico”.
- Hornilla “Ufesa”.
- Microscopio.
- Micropipetas de 0.5-5 ml “Single Chanel”.
- Burnout vernier digital “Truper”.

### 3.2. Materiales

- |   |                    |
|---|--------------------|
| ➤ Aguja bacteriológica.                   | ➤ Mechero.         |
| ➤ Algodón.                                | ➤ Nylon.           |
| ➤ Asa bacteriológica.                     | ➤ Papel madera.    |
| ➤ Cajas petri.                            | ➤ Pinzas.          |
| ➤ Frascos de vidrio con cierre hermético. | ➤ Portaobjetos.    |
| ➤ Gasa.                                   | ➤ Tubos de ensayo. |
| ➤ Guantes.                                | ➤ Velas.           |
| ➤ Hisopo.                                 | ➤ Viales.          |
|   | ➤ Lupa.            |



- Barbijo.
- Gorro.

### 3.3. Reactivos

- Agar BHI.
- Agar Muller Hinton.
- Alcohol destilado.
- Caldo urea.
- Discos de oxidasa.
- Peróxido de hidrogeno.
- Sangre desfibrinada de cordero.
- Solución fisiológica.
- Tetraciclina.
- Tinción gram.
- Suplemento *Helicobacter pylori*.

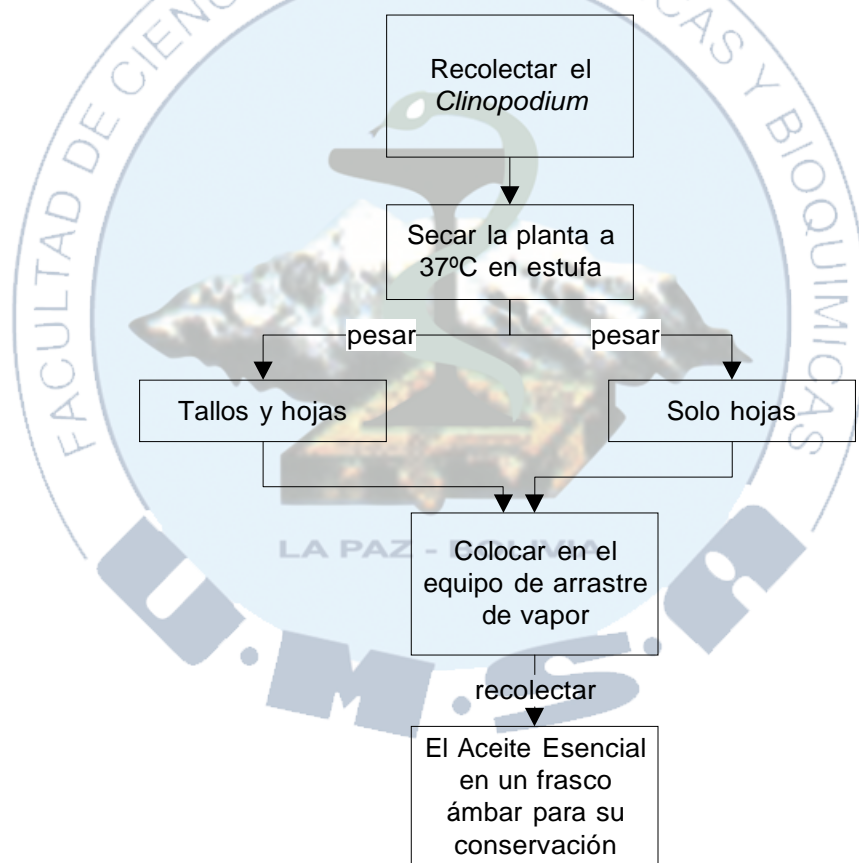
### 3.4. Métodos

#### 3.4.1. Material vegetal.

La especie *Clinopodium bolivianum* se recolectó en el mes de febrero del año 2012. En la comunidad Tanca, cantón Compi, provincia Murillo departamento de La Paz. Se realizó el secado de la planta en la estufa a 37 °C y fue llevado al herbario nacional de Bolivia para su autenticación y clasificación.

**3.4.1.1. Obtención del Aceite Esencial, Acido Ursólico y sus dos modificaciones estructurales del Clinopodium bolivianum.**

Para la obtención del aceite esencial se trabajó con la planta seca, por la técnica de arrastre de vapor. Como se muestra en la figura N° 8.



**Figura N° 8: Esquema para la obtención del Aceite Esencial del Clinopodium bolivianum.**

Para la obtención del compuesto mayoritario Acido Ursólico y sus dos modificaciones estructurales, se utilizó el compuesto ya aislado por Benigno Mamani (Licenciado en

Química) quien en el año 2011 realizo la extracción e identificación del compuesto mayoritario del *Clinopodium bolivianum*. En el instituto de investigación de la facultad de Ciencias Puras y Naturales con la colaboración del Instituto de Investigación Fármaco Bioquímicas UMSA.

### **3.4.2. Determinación de la actividad anti *Helicobacter pylori*.**

#### **3.4.2.1. Recuperación de cepas de *Helicobacter pylori*.**

Se obtuvieron cepas salvajes de *Helicobacter pylori*, cedidas en medio de caldo urea por el laboratorio de Microbiología del Hospital Arco Iris en la gestión 2012-2013. (ANEXO 1)

#### **3.4.2.2. Preparación de la muestra.**

Una vez trasladadas las muestras de biopsias al laboratorio de Microbiología del Instituto de Investigación Fármaco Bioquímicas, con la ayuda de un hisopo estéril se procedió a estrujar la muestra de biopsia presionándola contra las paredes del tubo para la cual es sembrada inmediatamente en medio de cultivo. (ANEXO 2).

#### **3.4.2.3. Medio de cultivo.**

El medio de cultivo empleado es el Agar BHI (Infusión Cerebro Corazón) suplementado con 7 % de sangre de carnero desfibrinada, más *Helicobacter pylori* Selective Supplement. (ANEXO 3)

#### **3.4.2.4. Incubación.**

Las placas se incubaron en frascos de vidrio con cierre hermético por 5 días a 37°C, la atmosfera microaeroflica se generó con 2 sobres de alkaseltzer (tableta efervescente de antiácidos) colocados en un frasco con 5 ml de agua estéril y vela encendida. (ANEXO 4)

#### **3.4.2.5. Identificación.**

##### **➤ Observación macroscópica.**

A los cinco días de incubación de la muestra recolectada de una biopsia positiva al test urea, se observa si existe desarrollo en las placas. Si al cabo de ese tiempo no hay la presencia del crecimiento de la bacteria se espera tres días más antes de desechar el cultivo. Se observarán colonias muy pequeñas de aproximadamente 0,5 mm de diámetro, translucidas, transparentes y brillantes que se asemejan a gotas de rocío de agua, algunas veces se presentó como una alfombra que tapiza el medio de cultivo. (ANEXO 5).

##### **➤ Observación microscópica.**

Se realizó la tinción de Gram, observando en el microscopio bacilos curvos en forma de u, alas de gaviota o helicoidales, gran negativos.

➤ **Identificación de las características bioquímicas.**

• **Prueba de la catalasa.**

Para la realización de esta prueba se toma las colonias sospechosas de *Helicobacter pylori* en un porta objetos esparciéndolo sobre la superficie luego se le coloca una gota de peróxido de hidrogeno y si la prueba es positiva se debe observar la presencia de burbujas blancas (burbujeo), si la prueba es negativa no se observara la formación de burbujeo.

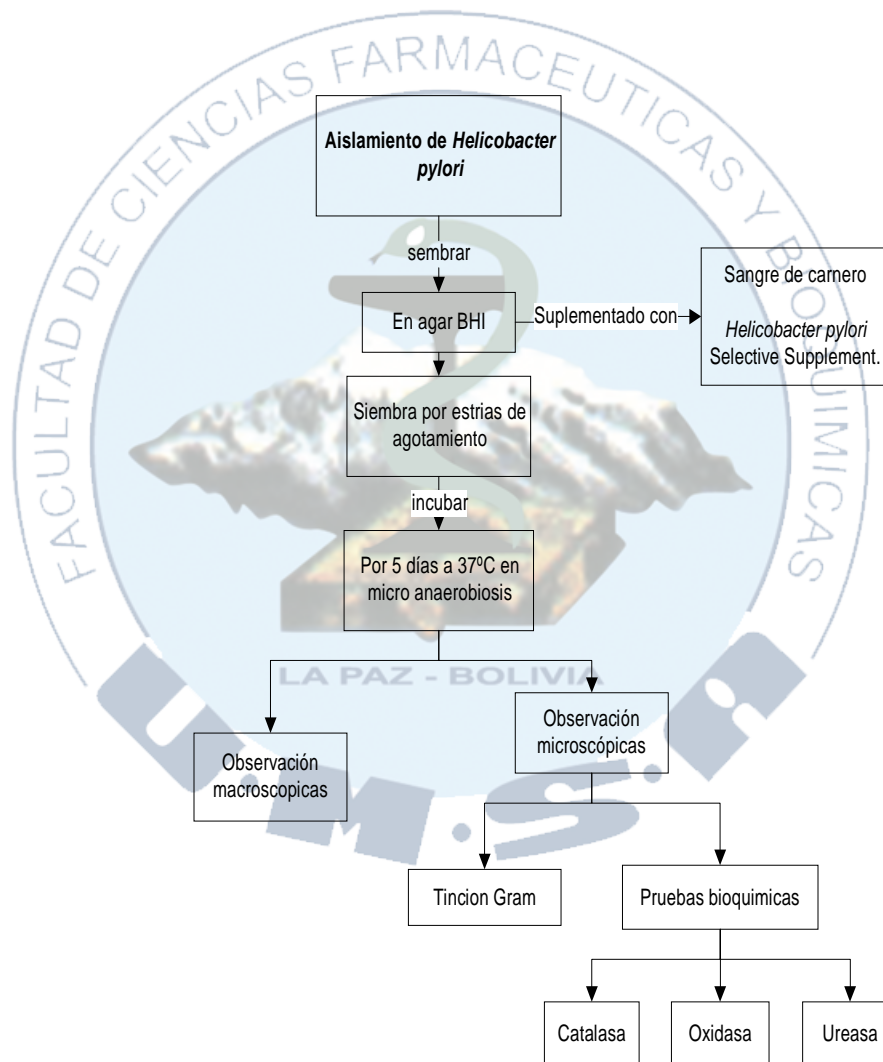
• **Prueba de la oxidasa**

La prueba de la oxidasa se la realizó mediante una suspensión en solución fisiológica de la bacteria a la cual se le agrego un disco de oxidasa y después de 5 minutos se observa el cambio de color del disco.

• **Prueba de la ureasa.**

En agar urea en pico de flauta se sembró colonias sospechosas de *Helicobacter pylori* se dejó en la estufa a 37°C por 24 horas y se observó el cambio de color del agar a una coloración rosada.

**3.4.2.6. Aislamiento del microorganismo de *Helicobacter pylori*.**



**Figura N° 9: Esquema para el aislamiento de *Helicobacter pylori* de acuerdo a Quisbert M., 2009 & Claros M., 2006.**



3.4.2.7. Difusión con disco del Acido Ursólico y sus dos modificaciones estructurales del *Clinopodium bolivianum*.

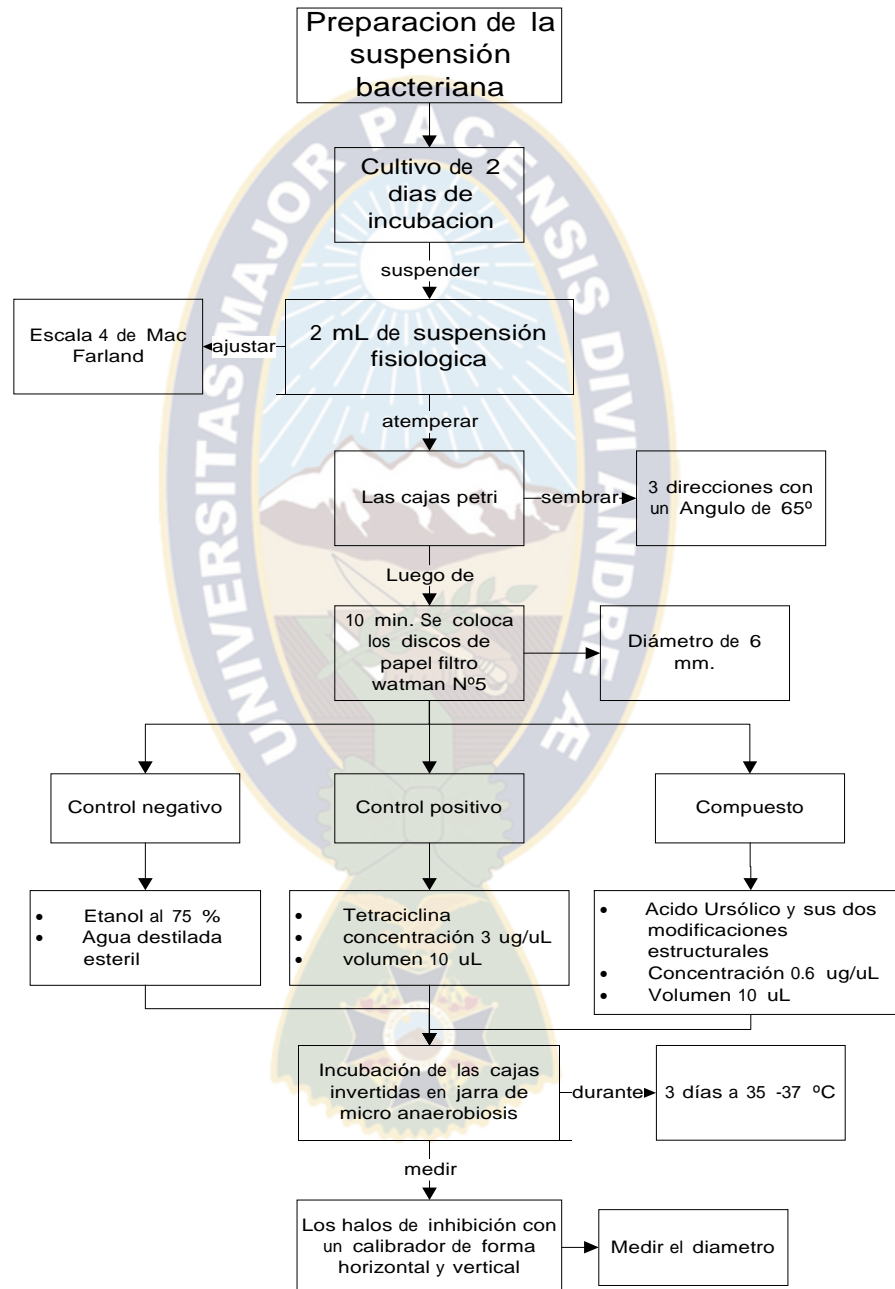
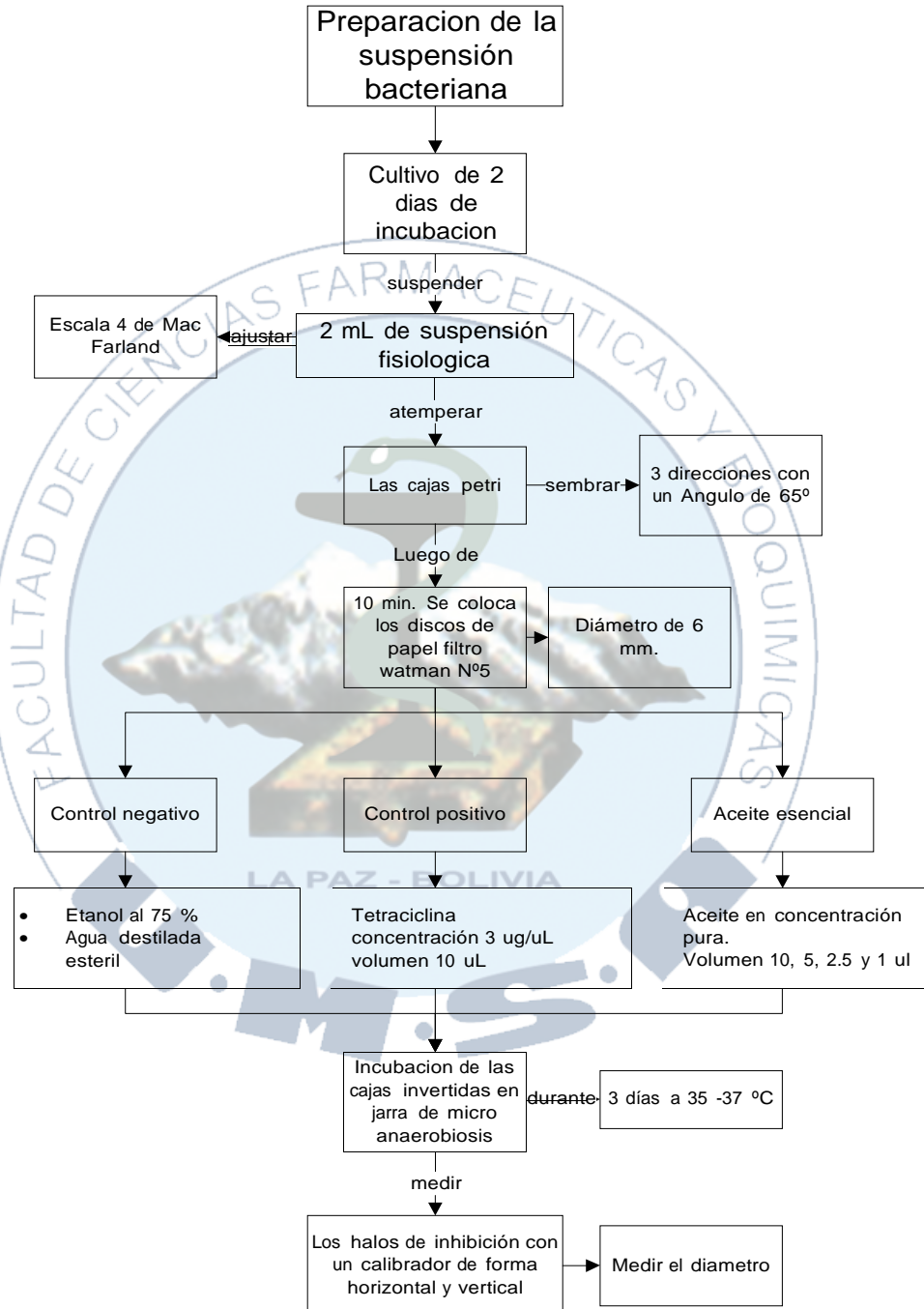


Figura N° 10: técnica de difusión en disco con el Acido Ursólico y sus dos modificaciones estructurales.

3.4.2.8. ***Difusión con disco del aceite esencial del *Clinopodium bolivianum*.***



**Figura N° 11: Técnica de difusión con disco del Aceite esencial del *Clinopodium bolivianum* para evaluar la actividad anti-*Helicobacter pylori*.**

3.4.2.9. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) por dilución en agar con antibiótico.

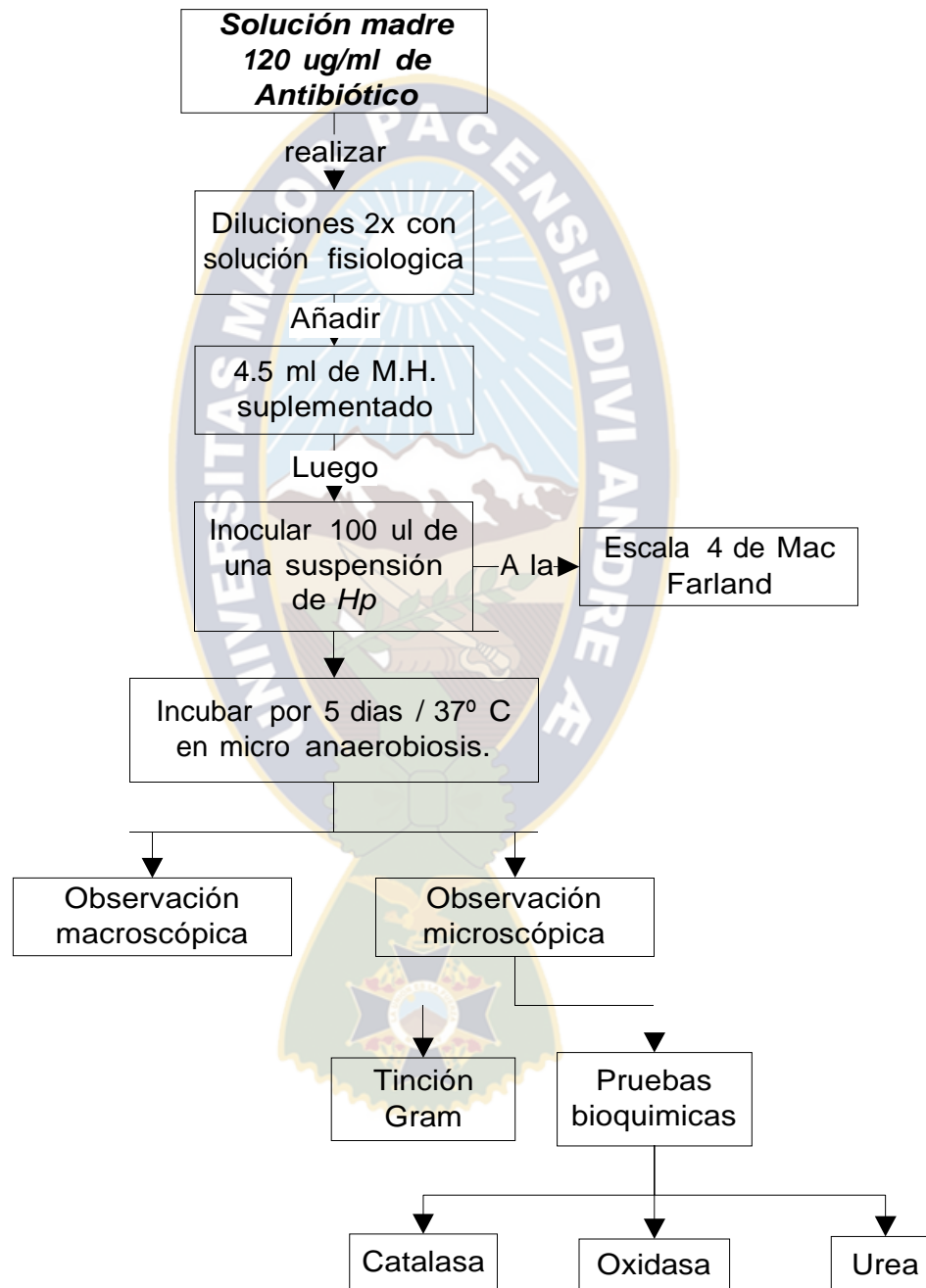
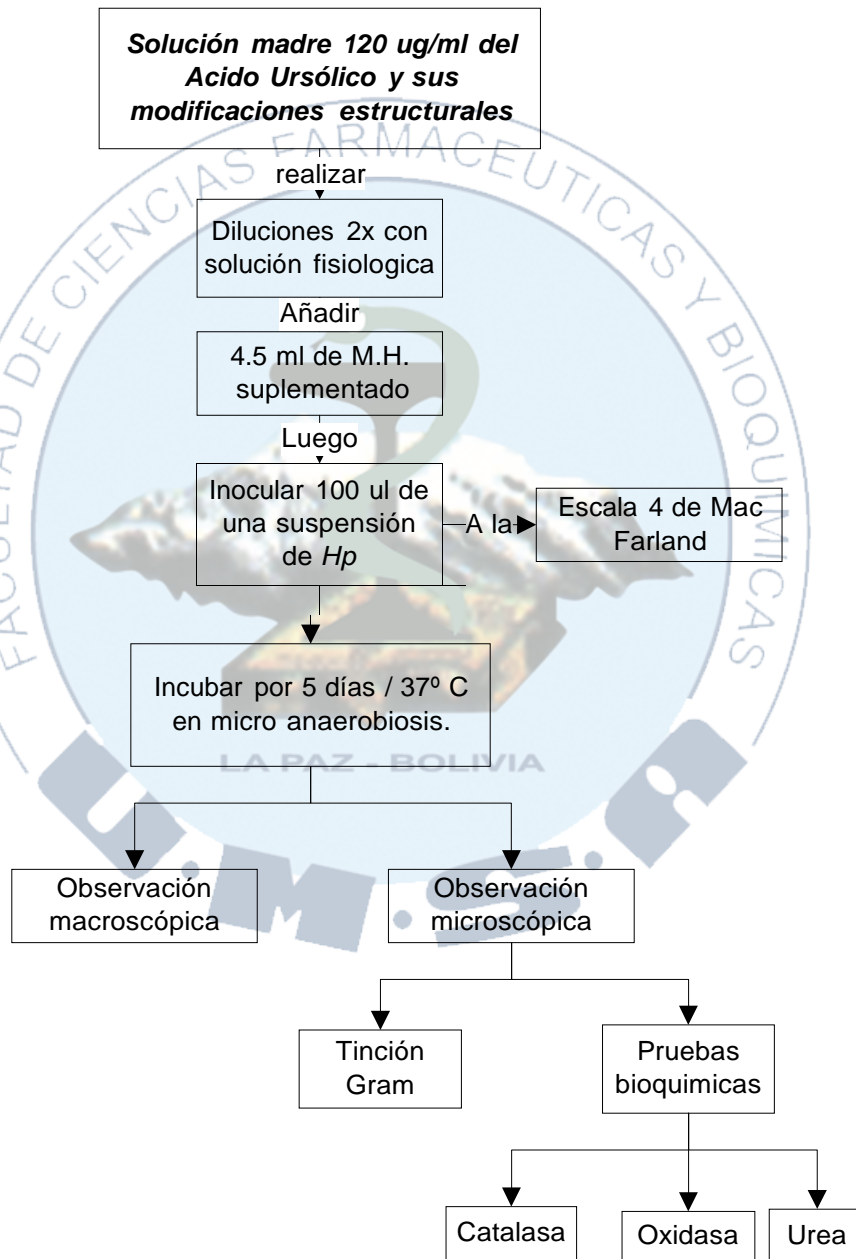


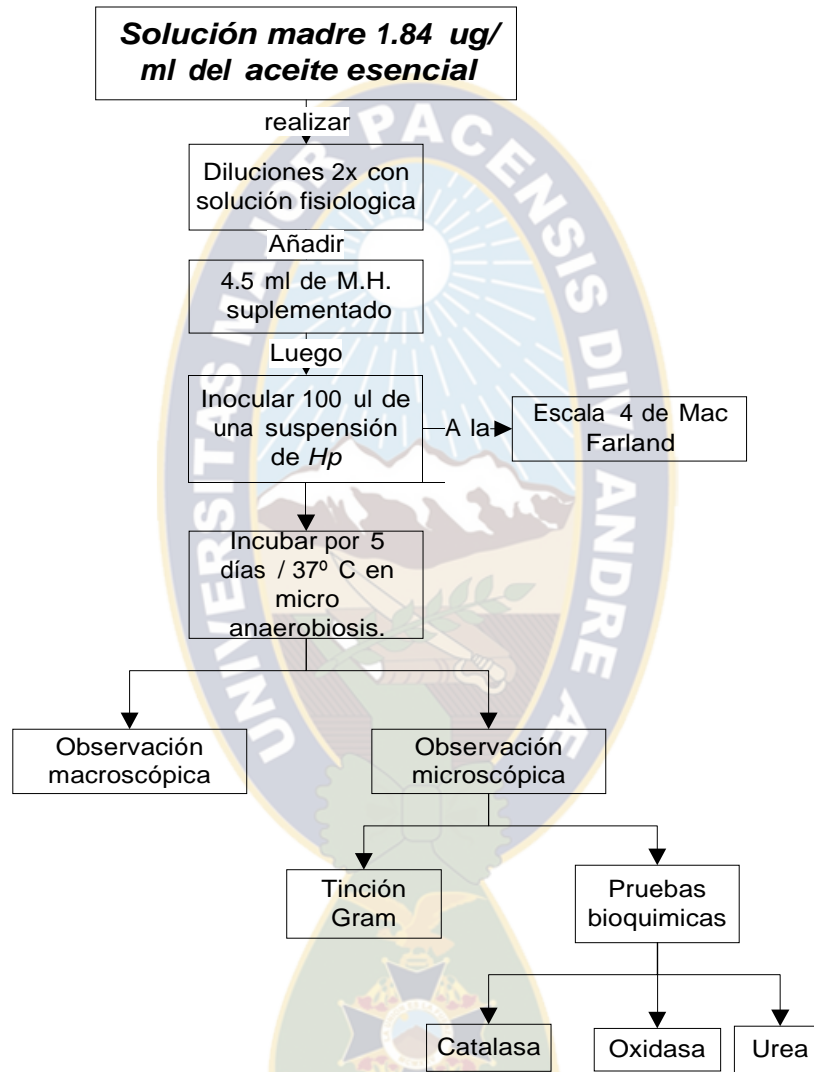
Figura N° 12: Técnica de dilución en agar para el control positivo (tetraciclina) frente a *Helicobacter pylori*.

**3.4.2.10. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) por dilución en agar con Acido Ursólico y sus dos modificaciones estructurales del *Clinopodium bolivianum*.**



**Figura N° 13: Técnica de dilución en agar del Acido Ursólico y sus dos modificaciones estructurales del *Clinopodium bolivianum* frente a *Helicobacter pylori*.**

**3.4.2.11. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) por dilución en agar con aceite esencial del *Clinopodium bolivianum*.**



**Figura N° 14: Técnica de dilución en agar del Aceite esencial del *Clinopodium bolivianum* frente a *Helicobacter pylori***

### 3.5. Estadística.

Paquete estadístico SYSTAT 11, Microsoft Excel.

#### 4. Resultados y Discusión.

##### 4.1. Rendimiento de aceite esencial del *Clinopodium bolivianum* por el método de arrastre de vapor.

Urrunaga en 1995 indicó que el rendimiento de aceite esencial evaluado en *Satureja boliviana* (*Clinopodium bolivianum*), es de 1,03%. Se considera apreciable dicho porcentaje, en comparación a otras especies aromáticas estudiadas en Perú.

Tabla 8

**Rendimiento en porcentaje volumen/masa del Aceite Esencial *Clinopodium bolivianum* obtenido por la técnica de arrastre en vapor, en el IIFB-FCFB-UMSA, abril 2012.**

Nº de extracciones	Peso de la planta (g)	Aceite esencial (mL)	Rendimiento %
1	150	4,8	3,2
2	150	4,4	2,93
3	450	9,9	2,2
4	350	9,5	2,71

En la extracción 1 y 2 se trabajó con hojas y tallos, de donde se obtuvo un mayor rendimiento en comparación con la extracción 3 y 4 que se trabajaron con solo hojas. Esta diferencia se debe a la presencia de tallos en la extracción 1 y 2 lo que permitía presentar unos pequeños socavones dentro de la canastilla generando mayor ingreso de vapor en las hojas, y de esta manera arrastrando mayor cantidad de Aceite. En cambio en



las extracciones 3 y 4 como solo eran hojas este no presento una buena circulación de vapor es por eso que el rendimiento fue menor. En total se obtuvo 28.6 ml de aceite esencial en un total de 1100 gramos de planta, la planta estaba previamente secada en estufa a una temperatura de 37 °C. El rendimiento obtenido de 2.76% en promedio de las 4 extracciones en comparación con el rendimiento obtenido en Perú de 1.03%, se puede indicar que el rendimiento del aceite esencial obtenido es mayor al esperado. El rendimiento también depende de la temporada de recolección de las hojas esto debido a la cantidad de humedad presente en el ambiente.

#### **4.2. Técnica de difusión con disco.**

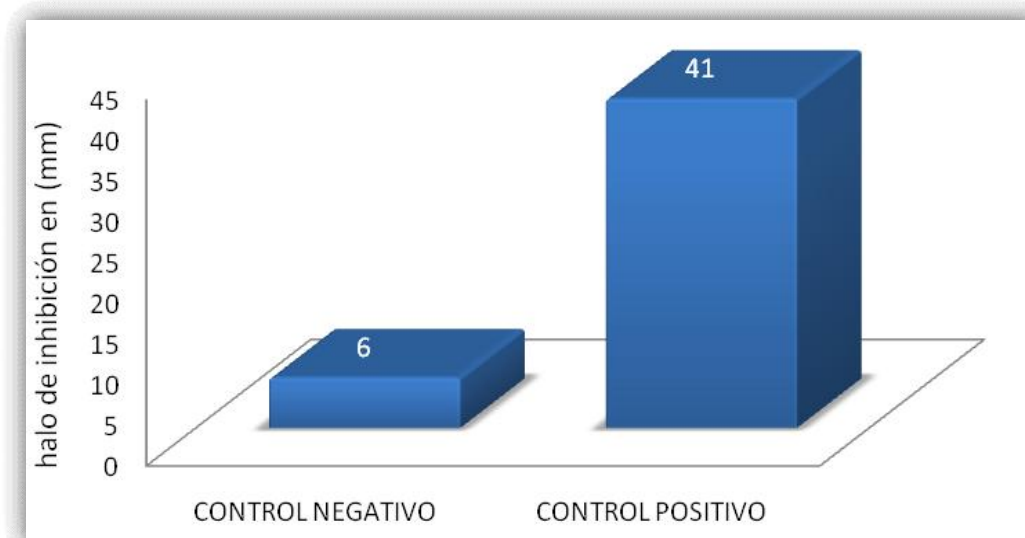
La difusión con disco es una de las técnicas más antiguas para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Esta técnica es adecuada para la evaluación de la mayoría de los patógenos bacterianos incluyendo los microorganismos exigentes más frecuentes, permite el estudio de una gran diversidad de antimicrobianos y prueba con extractos. Siendo una de las técnicas más recomendadas para el estudio de extractos, y nuevos antibióticos.

Tabla 9

**Actividad Anti-*Helicobacter pylori* de la Tetraciclina por la técnica de impregnación en disco, realizado en el IIFB-FCFB-UMSA a partir de enero a marzo del 2013.**

	Control Positivo	Control Negativo
<b>Promedio (mm)</b>	40.5+/- 0.7	6.18+/- 0.7
<b>Standard Dev.</b>	2.26	0.38
<b>Variación</b>	5.12	0.15
<b>C.V.</b>	0.05	0.06
<b>Actividad</b>	R	S

**Promedio: Diferencia significativa frente al control \*\*P<0.01**  
**Actividad: S= sensible halo de inhibición mayor a 30 mm; R= resistente halo de inhibición menor a 30 mm.**



**Figura 15:** Actividad Anti-*Helicobacter pylori* de la Tetraciclina por la técnica de impregnación en disco, realizado en el IIFB-FCFB-UMSA; en las columnas se compara al control negativo frente al control positivo.

La tabla 9 y figura 15 muestran los halos de inhibición de la tetraciclina sobre cepas salvajes de *Helicobacter pylori*, el diámetro es expresado en milímetros, también se observa los resultados del control negativo (agua estéril y etanol al 75%). Los discos de impregnación contienen 10 uL [3 ug/uL] del antibiótico, dando como concentración final de cada disco de impregnación 30 ug/ por disco.

La tetraciclina tiene un promedio en diámetro de halo de inhibición de 40.5 mm, las pruebas de susceptibilidad, se realizaron por triplicado y para cada compuesto en estudio, siendo los resultados el promedio.

Sea a seleccionado a la tetraciclina como control positivo debido a que es un tratamiento y terapia alternativo para la erradicación del *Helicobacter pylori* cuando fracasa la terapia de primera selección, además estudios revisados muestran tasas de resistencias de *Helicobacter pylori* de 1% para Norte América, 8% para Centro y Sur América; 5% para Asia y 2% para Europa (Ramírez et al., 2012).

El control negativo (agua estéril y etanol al 75%) no mostro halo de inhibición en ninguno de los casos, por lo que se reporta el diámetro del disco que es 6mm.

Estadísticamente la actividad de la tetraciclina frente al control negativo es significativa para un nivel de confianza del 99 %.

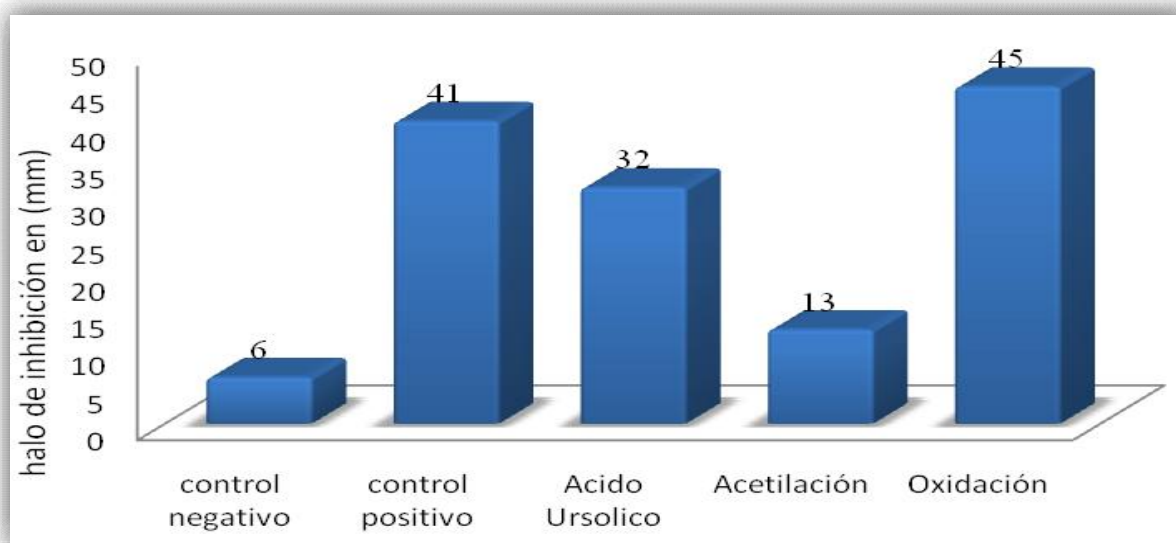
Tabla 10

Actividad Anti-*Helicobacter pylori* del Acido Ursólico y sus dos modificaciones estructurales frente al control negativo y control positivo realizado en el IIFB-FCFB-UMSA a partir de enero a marzo del 2013.

	Control Negativo	Control Positivo	Ac. Ursólico	Acetilación	Oxidación
<b>Promedio</b>	6.18	40.5**+/-0.7	31.6**+/- 2.1	12.6+/-3.9	45.1**+/-5.1
<b>Standard Dev.</b>	0.38	2.26	3.79	7.05	9.22
<b>Variación</b>	0.15	5.12	14.33	49.72	85.05
<b>C.V.</b>	0.06	0.05	0.12	0.56	0.20
<b>Actividad</b>	S	R	S	R	S

Promedio: Diferencia significativa frente al control \*\*P<0.01

Actividad: S= sensible halo de inhibición mayor a 30 mm; R= resistente halo de inhibición menor a 30 mm.



**Figura 16:** Actividad Anti-*Helicobacter pylori* del Acido Ursólico y sus dos modificaciones estructurales comparando con el control negativo y control positivo trabajo realizado en el IIFB-FCFB-UMSA a partir de enero a marzo del 2013

La tabla 10 y figura 16 muestran los halos de inhibición del compuesto mayoritario Acido Ursólico y sus modificaciones estructurales sobre cepas salvajes de *Helicobacter pylori*, el diámetro es expresado en milímetros. Los discos de impregnación contienen 10 uL [0.6 ug/uL] de los compuestos en estudio, dando como concentración final de cada disco de impregnación 6 ug/ por disco.

El promedio del diámetro del halo de inhibición del compuesto mayoritario Acido Ursólico es de 31.6mm, siendo considerado Sensible (ver tabla 10y figura 16) la actividad de este compuesto difiere en la muestra uno ya que el tamaño del halo en promedio es de 27.3mm es menor en comparación con las otras cuatro muestras.

En estudios anteriores con el ácido ursólico se reportó actividad antimicrobiana donde el ácido betaursólico inhibe el crecimiento de algunas variedades de *Staphylococcus*. Por esta razón, numerosas plantas de la familia de las labiadas que contienen ácido ursólico poseen propiedades antibacterianas y antifúngicas. Por ejemplo, la concentración mínima inhibitoria (CIM) de *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula officinalis* y *Origanum majorana* es de 500 y 250 µg/ml, también inhibe el crecimiento de *Microsporum lenosum* y *Candida albicans* a 250 µg/ml (Sattar et al., 1997). En este estudio se indica que el ácido ursólico a una concentración de 6 ug/uL presenta actividad anti-*Helicobacter pylori* con la presencia de un halo de inhibición de 31.6 mm.

El promedio del diámetro del halo de inhibición del compuesto modificado Acido Ursólico Acetilado es de 12.6 mm, siendo considerado Resistente (ver tabla 10 y figura 16) la actividad de este compuesto difiere en la muestra uno ya que el tamaño del halo en promedio es de 32.3mm es mayor en comparación a los que no produjeron inhibición, en cuatro muestras (en ninguna de las repeticiones), por lo tanto según la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) el halo que se registra es de 6 mm que corresponde al tamaño del disco.

El promedio del diámetro del halo de inhibición del compuesto modificado Acido Ursólico oxidado es de 45.1 mm, siendo considerado Sensible (ver tabla 7 y figura 15) la actividad de este compuesto difiere en la muestra uno por que presenta un promedio de halo de inhibición de 60 mm es mayor en comparación con las otras cuatro muestras.

Las modificaciones estructurales pueden aumentar o disminuir la actividad contra la bacteria, como se puede observar en la tabla 10 y figura 16 el Acido Ursólico Acetilado pierde la actividad contra el *Helicobacter pylori*, en cambio el Acido Ursólico Oxidado aumenta la actividad contra *Helicobacter pylori*, presentando un halo de 45.1 mm en comparación con el halo del Acido Ursólico de 31.6 mm se puede indicar que aumento la actividad contra la bacteria.

De acuerdo a la hipótesis planteada se puede afirmar que el Acido Ursólico presente en el *Clinopodium bolivianum*, si presenta actividad anti-*Helicobacter pylori*, y que las



modificaciones estructurales como se planteó si aumentan la actividad contra la bacteria en el caso del Acido Ursólico oxidado. Pero la modificación acetilada disminuye la actividad contra la bacteria *Helicobacter pylori*, confirmando la hipótesis.

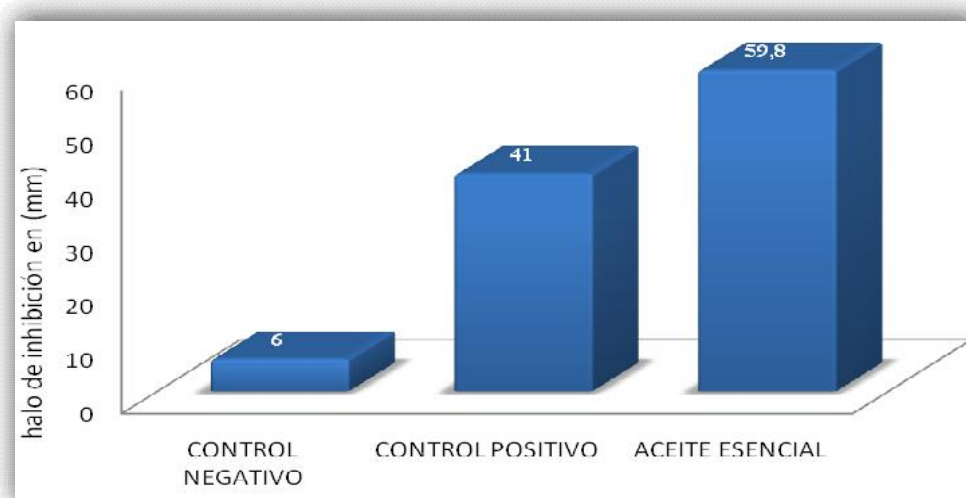
**Tabla 11**

Actividad Anti-*Helicobacter pylori* del Aceite Esencial frente al control negativo y control positivo realizado en el IIFB-FCFB-UMSA a partir de enero a marzo del 2013

	Control Negativo	Control Positivo	Aceite Esencial
<b>Promedio</b>	6.18	49.52 +/- 0.7	59.80 +/- 0.3
<b>Standard Dev.</b>	0.38	2.26	0.561
<b>Variación</b>	0.15	5.12	0.314
<b>C.V.</b>	0.06	0.05	0.009
<b>Actividad</b>	S	R	S

Promedio: Diferencia significativa frente al control **\*\*P<0.01**

Actividad: S= sensible halo de inhibición mayor a 30 mm; R= resistente halo de inhibición menor a 30 mm.



**Figura 17:** Actividad Anti-*Helicobacter pylori* del Aceite Esencial frente al control negativo y positivorealizado en el IIFB-FCFB-UMSA a partir de enero a marzo del 2013.

La tabla 11 y figura 17 muestran los halos de inhibición del Aceite Esencial sobre cepas salvajes de *Helicobacter pylori*, el diámetro es expresado en milímetros, de discos de impregnación con 10, 7.5, 5, 2.5 y 1 uL de los compuestos en estudio.

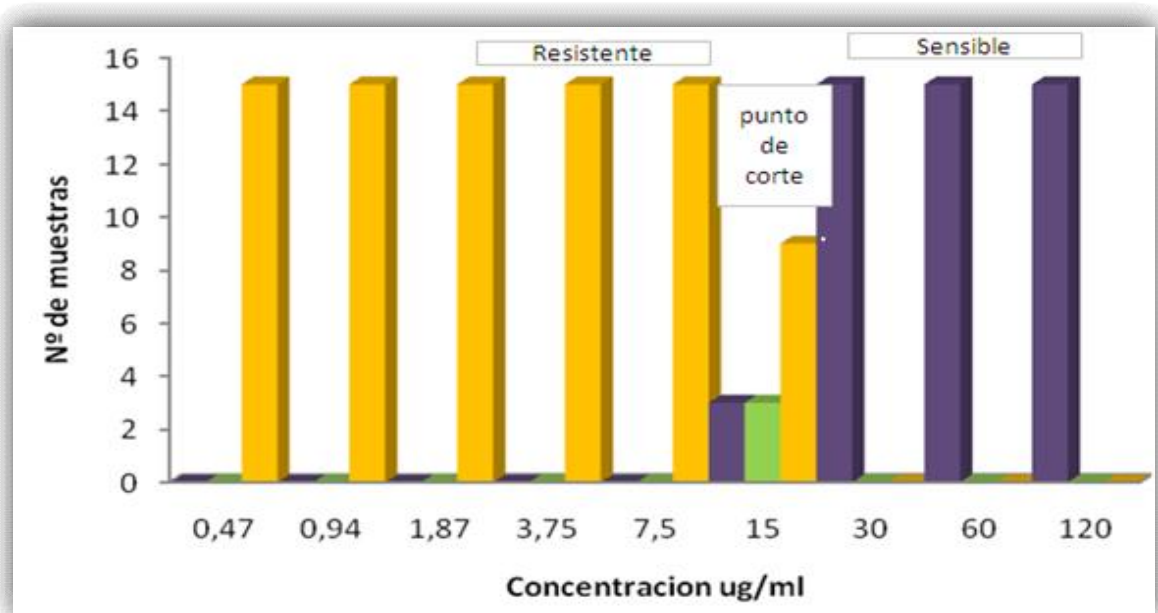
El promedio del diámetro del halo de inhibición del Aceite Esencial es de 59.8mm, siendo considerado Sensible, la actividad de este compuesto no presenta diferencia en las muestras. Pero si realizamos una comparación con el control positivo podemos indicar que el Aceite Esencial tiene mayor actividad contra la bacteria a comparación con el control positivo.

El Aceite Esencial del *Clinopodium bolivianum*, tuvo muchos estudios en los cuales se evaluó la actividad antibacteriana, anti fúngica e insecticida, donde presentó actividad antibacteriana, anti fúngica, además tiene actividad insecticida porque actúa contra huevos y larvas de *Triatoma infestans* (vinchuca) (Figuerola et al., 1995), pero no se reportaron estudios realizados con la *Helicobacter pylori*.

Se puede indicar que el Aceite Esencial extraído del *Clinopodium bolivianum*, si presenta actividad anti-*Helicobacter pylori* confirmando la hipótesis planteada.

#### 4.3. Técnica Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) por dilución en agar.

Las técnicas de dilución en caldo o agar, se pueden utilizar para medir cuantitativamente la actividad "in vitro" de un antimicrobiano frente a un cultivo bacteriano. Estos métodos se basan en la preparación de una serie de tubos o placas con caldo o agar, respectivamente, a los cuales se les agrega el antibiótico o compuesto en estudio, en distintas concentraciones. Luego se inoculan cada una de las placas con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio. Las pruebas se examinan después de incubar a 35°C y se determina la concentración inhibitoria mínima (CIM) del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado. El resultado final depende significativamente de la metodología empleada.



**Figura 18:** Susceptibilidad *in vitro* de la Tetraciclina de 15 cepas de *Helicobacter pylori* mediante la técnica del MIC por dilución en agar realizado en el IIFB-FCFB-UMSA a partir de abril a julio del 2013.

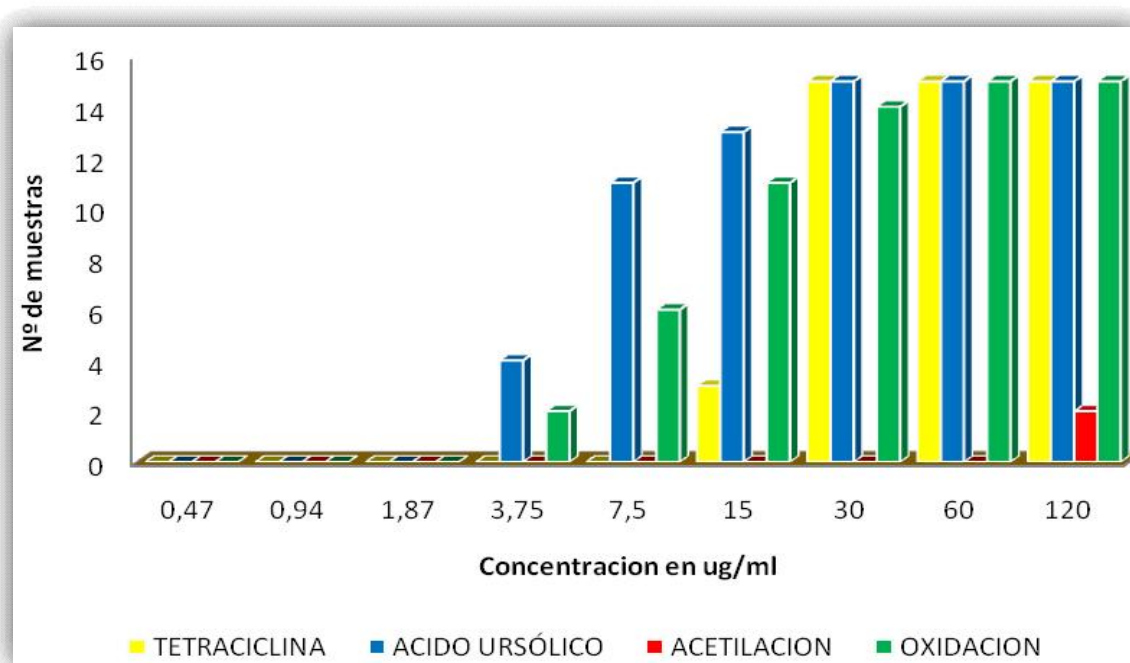
En la figura 18 se muestra el punto de corte (Breakpoint) en la concentración de 15 ug/ml del antibiótico, donde se puede indicar que concentraciones mayores a 15 ug/ml son sensibles (bandas moradas) y concentración menor 15 ug/ml (bandas naranjas) son resistentes a la Tetraciclina.

**Tabla 12**

Susceptibilidad *in Vitro* de la Tetraciclina frente al Acido Ursólico y sus dos modificaciones estructurales de 15 cepas de *Helicobacter pylori* mediante la técnica del MIC por dilución en agar realizado en el IIFB-FCFB-UMSA a partir de abril a julio del 2013.

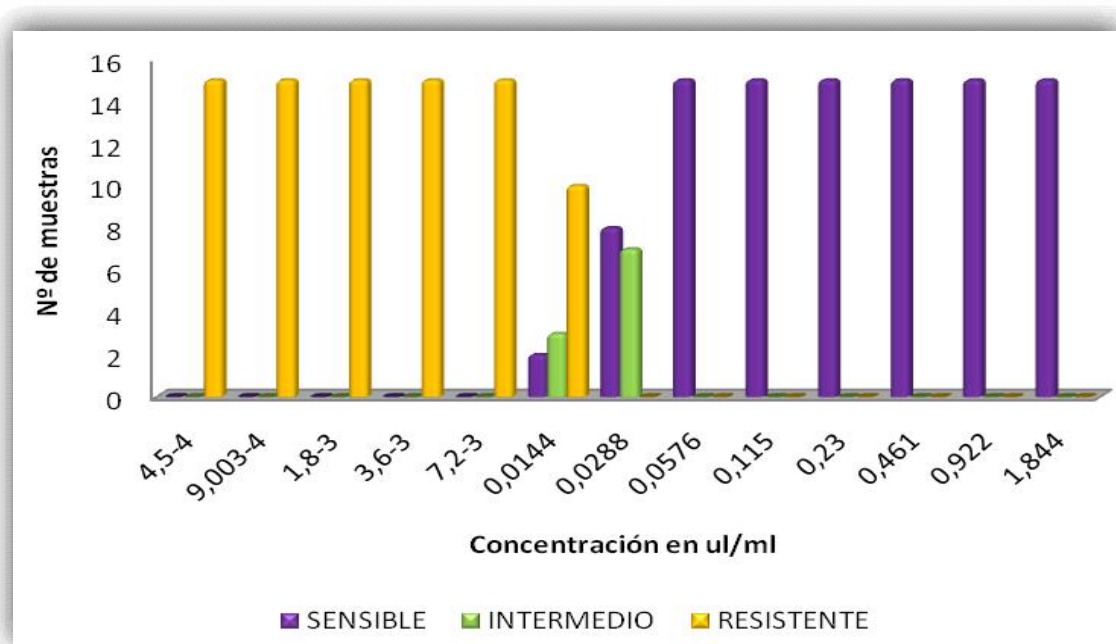
	Nº de cepas	Rango de dilución (ug/ml)	MIC90 (ug/ml)	Breakpoint (ug/ml)	Nº de cepas sensibles	Nº de cepas resistentes
<b>Tetraciclina</b>	15	120 – 0.47	30	>30 - <7.5	15	0
<b>Ac. Ursólico</b>	15	120 – 0.47	15	> 7,5 - < 1,87	15	0
<b>Acetilación</b>	15	120 – 0.47	> 120	> 120	2	13
<b>Oxidación</b>	15	120 – 0.47	15	> 15 - < 3,75	15	0

En la tabla 12 se realiza una comparación con el control positivo frente al Acido Ursólico y sus dos modificaciones estructurales; donde se muestran el MIC 90 de la tetraciclina a una concentración de 30 ug/ml, presentando una alta sensibilidad. El Acido Ursólico y el Acido Ursólico Oxidado presentan sensibilidad con un MIC 90 en la concentración 15 ug/ml y no presentan cepas resistentes. En cambio el Acido Ursólico Acetilado no presenta actividad anti-*Helicobacter pylori* y si se observa la presencia de cepas resistentes a estos compuestos.



**Figura 19:** Comparación del control positivo frente al Acido Ursólico y sus modificaciones en 15 cepas de *Helicobacter pylori* mediante la técnica del MIC por dilución en agar, realizado en el IIFB-FCFB-UMSA a partir de abril a julio del 2013.

En la figura 19 se observa una grafica donde se compara el control positivo (Tetraciclina) frente al Acido Ursólico y sus dos modificaciones estructurales referentes a la sensibilidad de cada uno. Se observa que el Acido Ursólico y el Acido Ursólico Oxidado presentan mayor sensibilidad en la bacteria que el antibiótico, teniendo un Breakpoint de 15 ug/ml.



**Figura 20:** Susceptibilidad *in Vitro* del Aceite Esencial de 15 cepas de *Helicobacter pylori* mediante la técnica del MIC por dilución en agar, realizado en el IIFB-FCFB-UMSA a partir de abril a julio del 2013.

En la figura 20 se muestra el Breakpoint (punto de corte) del Aceite Esencial en la concentración de 0.029 µg/ml del Aceite, donde se puede indicar que concentraciones mayores a 0.029 µg/ml son sensibles (bandas lilas) y concentración menor 0.0144 µg/ml son resistentes (banda naranja) a *Helicobacter pylori*.



**Tabla 13**

Susceptibilidad *in Vitro* del Aceite Esencial de 15 cepas de *Helicobacter pylori* frente al control positivo mediante la técnica del MIC por dilución en agua r, realizado en el IIFB-FCFB-UMSA a partir de abril a julio del 2013.

	N° de cepas	Rango de dilución	MIC90	Breakpoint (ug/ml)	N° de cepas sensibles	N° de cepas resistentes
<b>Tetraciclina</b>	15	0.47 – 120ug/ml	30 ug/ ml	>30 - <7.5	15	0
<b>Aceite Esencial</b>	15	4.5 <sup>-4</sup> – 1.844ug/ml	0.057ug/ml	>0.029- < 0.014	15	0

En la tabla 13 se muestran el MIC 90 del Aceite Esencial a una concentración de 0.057ug/ml donde se presenta una alta sensibilidad, en comparación con el control positivo (tetraciclina). Confirmando los resultados obtenidos con la técnica de difusión en disco, donde se observó inhibición completa de la bacteria.

Con los resultados obtenidos se confirma la hipótesis planteada indicando que el aceite esencial sí presenta actividad contra la bacteria en estudio y que la concentración mínima inhibitoria es de 0.057 ug/ml del aceite esencial del *Clinopodium bolivianum* (Khoa).

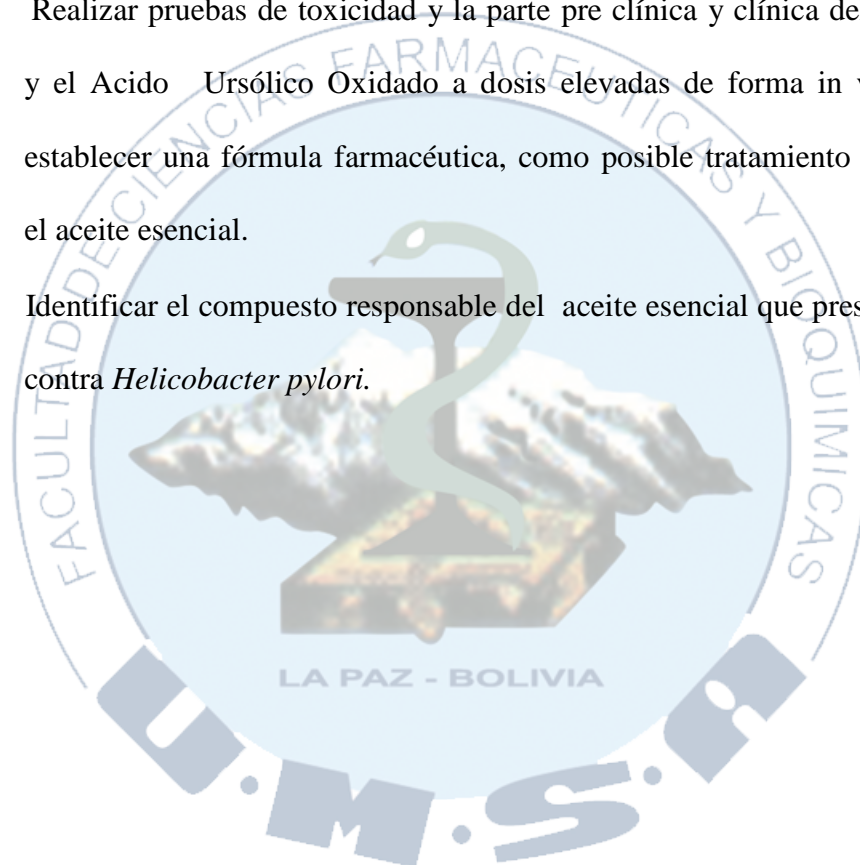
## 5. Conclusión

1. Se obtuvo el Aceite Esencial del *Clinopodium bolivianum* (Khoa) por la técnica de arrastre de vapor, para la evaluación de la actividad anti- *Helicobacter pylori*. Obteniéndose un rendimiento de 2.76 % (v/p) del Aceite.
2. La Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) control positivo utilizada tetraciclina fue de 30 ug/ml, no observándose resistencia en ninguna de las muestras. Esto debido a que la tetraciclina presenta una menor resistencia. Se determino que el Acido Ursólico y el Acido Ursólico oxidado (modificación estructural) tiene una actividad anti-*Helicobacter pylori* bien definida con un MIC de 15 ug/ml. Después de un análisis estadístico con el Acido Ursólico y sus modificaciones, podemos concluir que el Acido Ursólico y EL Acido Ursólico Oxidado presenta actividad anti-*Helicobacter pylori*. Y no así el Acido Ursólico Acetilado.
3. Se determino que el aceite esencial (monoterpenoides) del *Clinopodium bolivianum* tiene actividad anti-*Helicobacter pylori* con un MIC de 0.06 uL/mL, en comparación con el control positivo Tetraciclina que tiene un MIC de 30 ug/ml presentando una alta actividad.

4. La técnica de difusión con disco del control positivo tetraciclina presento un halo de 40.5 mm no observándose resistencia en ninguna de las muestras. En la técnica de difusión con disco se determino que el Acido Ursólico presenta un halo de inhibición de 31.6 mm y el Acido Ursólico oxidado (modificación estructural) presenta un halo de inhibición de 45.1 mm indicando que ambos compuestos tiene una actividad *anti-Helicobacter pylori* bien definida. En cambio el Acido Ursólico Acetilado presento un halo de inhibición de 12.6 mm, indicando que esta modificación pierde su actividad *anti-Helicobacter pylori*, y no así el Acido Ursólico oxidado el cual aumento la actividad contra la bacteria.
5. Se determinó que los aceites esenciales (monoterpenoides) del *Clinopodium bolivianum* tiene actividad *anti-Helicobacter pylori* con una inhibición completa hasta el volumen de 1 uL por disco.

## 6. Recomendaciones

- Realizar pruebas de toxicidad y la parte pre clínica y clínica con el Aceite Esencial del *Clinopodium bolivianum*.
- Evaluar la actividad antioxidante del aceite esencial.
- Realizar pruebas de toxicidad y la parte pre clínica y clínica del Acido Ursólico y el Acido Ursólico Oxidado a dosis elevadas de forma in vivo. Para luego establecer una fórmula farmacéutica, como posible tratamiento al igual que con el aceite esencial.
- Identificar el compuesto responsable del aceite esencial que presenta la actividad contra *Helicobacter pylori*.



## 7. Bibliografía

- ✓ 1994. NIH Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH Consensus Development Panel on *Helicobacter pylori* in Peptic Ulcer Disease. JAMA 272:65-69.
- ✓ 1997. Current European concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection. The Maastricht Consensus Report. European *Helicobacter pylori* Study Group. Gut 41:8-13.
- ✓ Alarcón T, Domingo D, López-Brea M. 1999; Antibiotics resistance problems with *Helicobacter pylori*. Intern J Antimicrob Agents 12: 19-26.
- ✓ Alba Posse Ricardo Sebastián, Toledo Roberto Alejandro, Viana Cabral María Lourdes. HELICOBACTER PYLORI: Clínica, Diagnóstico y Tratamiento. Revista de Posgrado de la Vía Cátedra de Medicina - N° 158 – Junio 2006
- ✓ Alexander N. Schmidt-Lebuhn Etnobotánica, usos y aceites esenciales de *Minthostachys* (Lamiaceae): ¿Dónde estamos, adónde vamos? Institute of Systematic Botany, University of Zurich, Switzerland. Rev. Sociedad Científica Boliviana de Botánica. Vol 4 N°2 220
- ✓ Alonso, J. 1998. Tratado de Fitomedicina. Bases Clínicas y Farmacológicas. Isis Ediciones. Buenos Aires, Argentina, pág. 191.
- ✓ Altintas E., Sezgin O., Oguz Ulu, Ozlem Aydin, Handan Camdeviren. Maastricht II treatment scheme and efficacy of different proton pump inhibitors in eradicating *Helicobacter pylori*. World J Gastroenterol 2004;10(11):1656-1658

- 
- ✓ Amieva Mr, El-Omar Em. 2008. Host bacterial interactions infection. *Gastroenterology*; 134: 306 – 23.
  - ✓ Andrews J, Marsden B, Brown D, Wong Vs, Wood E, Kelsey M. 2001. Comparasion of three stool antigen tests for *Helicobacter pylori* detection. *J Clin Pathol*; 56: 769-771.
  - ✓ Arroyo Dres. J., Pareja B., RaezJ., Marzo de 1999. Efecto cicatrizante del *Piper angustifolium* R. & P. sobre lesiones de piel inducidas en animales de Experimentación. *Folia Dermatológica Peruana* - Vol. 10 • Nº1.
  - ✓ Atherton J, Peek Rm, Tham Kt, Cover Tl, Blaser Mj. 1997a Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene in *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol*; 112: 92 – 99.
  - ✓ Atherton J. 1997b. The clinical relevance of strain types of *Helicobacter pylori*. *Gut*; 40: 701 – 3.
  - ✓ Azaz, D., Demirci, F., Satil, F., Kurkc,uoglu, M. and K. H. C. Baser (2002). Antimicrobial activity of some Satureja essential oils. *Zeitschrift fur Naturforschung* 57c, 817-821.
  - ✓ Bannerman, T. L. 2003. *Staphylococcus, Micrococcus*, and other Catalase-Positive
  - ✓ Barer, M. R. 2000. Bacterial growth and physiology, p. 36-44. *In* D. Greenwood, R.
  - ✓ Bauerfeind P, Garner R, Dunn B, Mobley H. 1997. Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. *Gut*; 40: 25-30.
  - ✓ Beswick E, Suarez G, Reyes V. 2006. *Helicobacter pylori* and host interactions that influence pathogenesis. *World J Gastroenterol*; 12: 5599-5605.



- ✓ Bilbao P., 2006 Estudio de la Infección por *Helicobacter pylori* y Evaluación de los Métodos de Diagnostico Laboratorial, en Pacientes que Acuden a Consultas de Gastroenterología en la Clínica “Caja Petrolera de Salud” y el Hospital “Arco Iris” de Junio 2005 a Abril 2006 en la Ciudad de La Paz - Bolivia, Tesis de Grado, FCFB-INLASA, La Paz - Bolivia.
- ✓ Bizzozero G. 1893 Ueber die schlauchfermigen drusen des megendarmkanals und die bazichungen ihres epithels zudem oberfachnepithel der scheinhaur. Arch. F. Mikr. Anat; 42: 82 – 152.
- ✓ Blaser Martin J. Ecology of *Helicobacter pylori* in the Human Stomach. The Journal of Clinical Investigation 1997 August, Volume 100, Number 4, 759–762.
- ✓ Blaser Mj, Pérez-Pérez Gi, Kleanthous H, Cover Tl, Peek Rm, Chyou Ph, Stemmermann Gn, Nomura A. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. Cancer Res. 1995; 55: 2111 – 15.
- ✓ Bourdy, G., Quenevo C., Giménez, A., Tacana Ecuánasha Aquí, Ecuánasha Id´rene Cuana, Me Shanapaque. FONAMA, IRD, UMSA, CIPTA, 1999 La Paz, Bolivia
- ✓ Cabrera, A.L. Flora de la Provincia de Jujuy. Parte IX. INTA, Secretaría de Agricultura y Ganadería de la Nación. (1983) Pág. 148. (1970)
- ✓ Cantón, R., Boixeda, D., de Rafael, L., Baquero, F. (1995). Factores de virulencia y mecanismos de patogenicidad de *Helicobacter pylori*. Gastroenterol Hepatol; 18 (supl 2): 15-22.

- 
- ✓ Carhuapoma M. Actividad anti-*Helicobacter pylori* y antioxidante del aceite esencial de *Satureja brevicalyx*. Rev Acad Peru Salud 2007. 17(1)
  - ✓ Castillo I., Rivero F., Helicobacter pylori activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*, Journal of Ethnopharmacology 114 (2007) 72-77.
  - ✓ Cavalier-Smith T. The neomuran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. Int J Syst Evol Microbiol. 2002; 52: 7 – 76.
  - ✓ Cerezo S, Ponce M Y Gutiérrez G. Diagnóstico microbiológico, serológico, genotipificación de *Helicobacter pylori* aislado de biopsias de niños y adultos. Detección molecular de la isla de patogenicidad *cag* de *Helicobacter pylori*. Revista Latinoamericana de Microbiología. 2006; 2: 99 – 104.
  - ✓ Chávez F., A Randa M., García A. Los polifenoles antioxidantes extraídos del epicarpio de Palta (*Persea americana* var. Hass) inhiben la ureasa de *Helicobacter pylori*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 2011. 10 (3): 265 – 280.
  - ✓ Chiarini A, Calà C, Bonura C, Gullo A, Giuliana G, Peralta S, D'arpa F, Giammanco A. Prevalence of virulence-associated genotypes of *Helicobacter pylori* and correlation with severity of gastric pathology in patients from Western Sicily, Italy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009; 28: 437 - 46.
  - ✓ Chromvarin C, Namwat W, Chaicumpar K, Mairiang P, Sangchan A, Sripa B, Tor-Udom S, Vilaichone Rk. Prevalence of *Helicobacter pylori vacA, cagA, cagE, iceA* and *babA2* genotypes in Thai dyspeptic patients. Int J Infect Dis 2008; 1: 30 – 6.

- 
- ✓ Claros P. Maysa, Bilbao R. Pablo, Damiani M. Esther, Gonzales D. Eduardo, Estensoro C. Miguel, Alvarez A. María T. Actividad anti-*Helicobacter pylori* de *Plantago major*, *Clinopodium bolivianum*, *Caléndula officinalis* y *Piper angustifolium* por el método de difusión de disco. BIOFARBO. 2007v.15 n.1
  - ✓ Cover, T.L. (1997a). Commentary: *Helicobacter pylori* transmission, host factors, and bacterial factors. *Gastroenterology*; 113 (suppl 1): S29-S30.
  - ✓ De Boer, W. A. and G. N. Tytgat. 2000. Regular review: treatment of *Helicobacter pylori* infection. *BMJ* 320:31-34. 96. Goddard, A. F. 1998. Getting to the route of *Helicobacter pylori* treatment. *J Antimicrob Chemother* 42:1-3.
  - ✓ De Groote, D., Lee, A. Other *Helicobacter*. *Curr Opin in Gastroenterol*, 2000; 16: 556-60.
  - ✓ De Rafael, L., Mir, N., Valdezate, S., Cantón, R. (1995). *Helicobacter pylori*: aspectos microbiológicos. *Gastroenterol Hepatol*; 18 (supl 2): 3-14.
  - ✓ Di Lorenzo. Subcommittee on chronic abdominal pain. Chronic Abdominal pain in children. *Pediatrics* 2005; 115: 370-381.
  - ✓ Doenges J. L. Spirochetes in the gastric glands of macacus rhesus and humans without definite history of related disease. *Proc Soc Exp Med Biol*. 1938; 38: 536-38.
  - ✓ Doyle J, Evans J and Evans D. *Helicobacter pylori* CagA: Analysis of sequence diversity in relation to phosphorylation motifs and implications for the role of cagA as a virulence factors. *Helicobacter*. 2001; 6: 187 – 98.

- ✓ Dubreuil, J.D., Del Giudice, G., Rappuoli, R. (2002). *Helicobacter pylori* interactions with host serum and extracellular matrix proteins: potencial role in the infectious process. *Microbiol Mol Biol Rev*; 66 (4): 617-629.
- ✓ Emilia G, Luppi M, Zucchini P, Morselli M, Potenza L, Forghieri F, Volzone F, Jovic G, Leonardi G, Donelli A, Torelli G. *Helicobacter pylori* infection and chronic immune thrombocytopenic purpura: long-term results of bacterium eradication and association with bacterium virulence profiles. *Blood*. 2007; 110: 3833-41.
- ✓ Erzin Y, Koksall V, Altun S, Dobrucali A, Aslan M, Erdamar S, Dirican A, Kocazeybek B. Prevalence of *Helicobacter pylori vacA, cagA, babA* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkish patients with dyspepsia. *Helicobacter*. 2006; 11: 574 - 80.
- ✓ Falsafi T, Walizadh N, Sepehr S, Najafi M. Application of a stool antigen test to evaluate the incidence of *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents from Tehran, Iran. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12: 1094-1097.
- ✓ Figueroa Soliz Nelson, Esteves Martini Tito, Gimenez Turba Alberto. Propiedades antibacterianas, antimicóticas e insecticidas de Aceites esenciales de especies vegetales aromaticas nativas. IIFB-FCFB-UMSA. DICIEMBRE 1995.
- ✓ Flores E. N. Metabolitos secundarios bioactivos de especies del género Piper de la flora boliviana, soportes audiovisuales e informáticos serie tesis Doctorales, Curso 2006/07 Ciencias y tecnologías/25, pg. 24

- ✓ Francesco V., Giorgio F., Hassan C., et.al. Worldwide; H. pylori antibiotic resistance: a systematic susceptibility of helicobacter pylori to levofloxacin 229 review. Journal of Gastrointestinal and Liver Disease.2010; 19(4): 409-414
- ✓ Freedberg AS, Barón LE La presencia de espiroquetas en la mucosa gástrica humana. Am. J. Dig. Dis. 1940; 7 :443-445
- ✓ Fuertes C, Murguía Y. Estudio comparativo del aceite esencial de *Mintostachys mollis* (Kunth) Griseb “muña” de tres regiones peruanas por cromatografía de gases y espectrometría de masas. Rev. Ciencia e Investigación 2001; VI (1): 23-39.
- ✓ Garrity, G.M., Bell, J.A., Lilburn, T. (2005). Familia II. Helicobacteraceae. En: Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., Garrity, G.M. editores. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol II. 2ª ed. The Proteobacteria. Part C. The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria. Nueva York: Springer; p. 1168.
- ✓ Gisbert Jp. ; Rescue therapy after Helicobacter pylori eradication failure. Gastroenterología y Hepatología. 2011; 34(2): 89-99.
- ✓ Goddard, A. F. 1998. Getting to the route of *Helicobacter pylori* treatment. J Antimicrob Chemother 42:1-3.
- ✓ Gonzales, Eduardo. Iglesias Irene, Carretero Emilia and Villar Angel 1998. “especies antiinflamatorias de la flora Boliviana”. Madrid-España.
- ✓ Goodwin, C.S., Armstrong, J.A., Chilvers, T., Peters, M., Collins, M.D., Sly, L., McConell, W., Harper, W.E.S. (1989). Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* com. nov.



- and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int J Syst Bacteriol*; 39: 397-495.
- ✓ Graham D and Shiotani A. 2008; New concepts of resistance in the treatment of *Helicobacter pylori* infections. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 5:321-31.
  - ✓ Graham, D. Y., G. M. Lew, H. M. Malaty, D. G. Evans, D. J. Evans, Jr., P. D. Klein, L. C. Alpert, and R. M. Genta. 1992. Factors influencing the eradication of *Helicobacter pylori* with triple therapy. *Gastroenterology* 102:493-496.
  - ✓ Gregory W., Guttmacher A. Genómica microbiana y enfermedades Infecciosas. *N Engl J Med* 2011; 365:347-357
  - ✓ Hansen PGo M, Varming K, Andersen L, Genta R, Graham D, Nielsen H. Proinflammatory activation of neutrophils and monocytes by *Helicobacter pylori* in patients with different clinical presentations. *Infect Immun* 1999;31:3171-4. Medline.
  - ✓ Hentschel, E., G. Brandstatter, B. Dragosics, A. M. Hirschl, H. Nemeč, K. Schutze, M. Taufer, and H. Wurzer. 1993. Effect of ranitidine and amoxicillin plus metronidazole on the eradication of *Helicobacter pylori* and the recurrence of duodenal ulcer. *N Engl J Med* 328:308-312.
  - ✓ Heywood, V. H. Flowering plants of the World. 1978, Oxford University Press, Oxford, 335.
  - ✓ Hildebrand, P., P. Bardhan, L. Rossi, S. Parvin, A. Rahman, M. S. Arefin, M. Hasan, M. M. Ahmad, K. Glatz-Krieger, L. Terracciano, P. Bauerfeind, C. Beglinger, N.



- Gyr, and A. K. Khan. 2001. Recrudescence and reinfection with *Helicobacter pylori* after eradication therapy in Bangladeshi adults. *Gastroenterology* 121:792-798.
- ✓ Horn, J. 2000. The proton-pump inhibitors: similarities and differences. *Clin Ther.* 22:266-280.
  - ✓ <http://www.ursolicacid.com/botanical.htm>
  - ✓ Ibraghimov A, Pappo J. The immune response against *Helicobacter pylori* – a direct linkage to the development of gastroduodenal disease. *Microb Infect* 2000;2:1073-7. Medline.
  - ✓ Innocenti, M., A. M. Svennerholm, and M. Quiding-Jarbrink. 2001. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides preferentially induce CXC chemokine production in human
  - ✓ J. M. Pajares And J. P. Gisbert; *Helicobacter pylori*: su descubrimiento e importancia en la medicina. *REV ESP ENFERM DIG* 2006; 98(10): 770-785
  - ✓ Jaworski W. *Podręcznik chorób (Handbook of Gastric Diseases)*. Wydawnictwa Dziel Lekarskich Polskich, 1899, pp. 30-47.
  - ✓ Kearney, D. J. 2003. *Helicobacter pylori* Infection. *Current Treatment Options in Infectious Diseases* 5:197-206.
  - ✓ Krienitz W. Ueber das auftreten von spirochaeten verschiendner form im mageningalt bei carcinoma ventriculi. *Dtsch Med Wochenschr.* 1906; 32: 872.
  - ✓ Lewis, D.A., Hanson, P.J. Anti-Ulcer drugs of plant origin. In: *Progress in Medicinal Chemistry*. Rev. Elsevier 1991. 28, 201-231.

- ✓ Long M, Luo J, Li Y, Zeng Fy, Li M. Detection and evaluation of antibodies against neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* in patients with gastric cancer. World J Gastroenterol. 2009; 15: 2381 - 8.
- ✓ López-Brea M, Alarcón T, Domingo D, Sánchez I, Martínez Mj, Sanz Jc. Evaluación de una técnica de western-blot (Helicoblot 2.0) para la detección de anticuerpos frente a antígenos específicos de *Helicobacter pylori* en niños. Enferm Infecc Microbiol Clin 1998; 16: 275-9.
- ✓ López-Brea M, Jiménez M, Blanco M, Pajares JM. *Campylobacter* en patología gástrica. Microbiología 1985; 1: 97 - 99.
- ✓ Mamani, Benigno. 2011. Hemisíntesis del compuesto mayoritario de la Satureja boliviana (KHOA) y evaluación preliminar de la actividad antiinflamatoria. UMSA-FCPN-IIPN
- ✓ Marignani M, Angeletii S, Bordi C. Reversal of long-standing iron deficiency anaemia after eradication of *Helicobacter pylori* infection. Scand J Gastroenterol 1997; 32: 617 - 22.
- ✓ Marshall B, Goodwin C. Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. Inf J Syst Bacteriol. 1987; 37: 68.
- ✓ Marshall B, Royce H, Anner D.I. Original isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa. Microbios Lett. 1984; 25: 83 - 88.
- ✓ McNulty C, Owen R, Tompkins D, Hawtin P, McColl K, Price A, Smith G, Teare L, PHLS 2002; Helicobacter Working Group. *Helicobacter pylori* susceptibility testing by disc diffusion. J Antimicrob Chemther. 49: 601 - 9.

- 
- ✓ Mégraud F, Lehours P. 2007; *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Rev. 20: 280-322.
  - ✓ Mégraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori*. Clin Gastroenterology. 1995; 9: 507 – 18.
  - ✓ Megraud, F. H. pylori species heterogeneity. En: Hunt R.H. y Tytgat G.N.J. eds *Helicobacter pylori. Basic mechanisms to clinical cure*. Lancaster: Kluwer Academic Publishers: 1994: 28-40.
  - ✓ Meyer Rosberg K. et al. The effect of environmental pH on the proton motive force of *Helicobacter pylori*. Gastroenterol 1996;111:886-900. Medline
  - ✓ Miranda N. M. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de *Piper elongatum* (matico) administrado por vía oral, comparado con indometacina en cobayos; Rev. Situa 2001– Peru Año 10 - N° 19 - Setiembre-Diciembre
  - ✓ Monzote L, Sariego I, Montalvo A, Garrido N, Scull R, Abreu J. Propiedades antiprotozoarias de aceites esenciales extraídos de plantas cubanas. Rev Cubana Med Trop. 2004;56(3):230-233
  - ✓ Morris A, Nicholson G. Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. Am J Gastroenterol. 1987; 82: 192 – 99.
  - ✓ Muto Y, Ninomiya M y Fujiki H. Present status research on cancer chemoprevention in Japan. Japanese J of Clinical Oncology 1990;20:219-24.
  - ✓ Nvström J, Svennerholm Am. Oral immunization with HpaA affords therapeutic protective immunity against *H. pylori* that is reflected by specific mucosal immune responses. Vaccine. 2007: 25; 2591 – 8.

- ✓ Olfat F, Zheng Q, Oleastro M, *et al.* Correlation of the *Helicobacter pylori* adherence factor BabA with duodenal ulcer disease in four European countries. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 44: 151-156.
- ✓ P Malfertheiner, F Megraud, C O'Morain, F Bazzoli, E El-Omar, D Graham, R Hunt, T Rokkas, N Vakil, E J Kuipers. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007;56:772-781
- ✓ Palacios V. "Plantas Medicinales Nativas". *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONCYTE*. 2º ed. Perú; 1997.
- ✓ Palmer, Ed. Investigation of the gastric spirochaetes of the human. *Gastroenterol.* 1954; 27: 218 – 20.
- ✓ Parmar, V. S., Jain, S.C., Bisht, K.S., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., Tyagi, O.M., Prasad, A.K., Wengel, J., Olsen, C.E., Boll, P. M.,. Phytochemistry of genus Piper. *Phytochemistry* 1997. 46, 597-673.
- ✓ Peek, R.M. (2003). The politics of *H. pylori*-challenged mice: liberal permissiveness versus conservative restriction. *Gastroenterology*; 124 (2): 577-578.
- ✓ Pfaller M.A., and Tenover F.C. (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- ✓ Pitt, T. L. 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.

- ✓ Quisbert, Miriam. 2009. Evaluacion de la actividad anti-*Helicobacter pylori* del *Clinopodium bolivianum* (Khoa) y *Piper elongatum* (Matico) mediante la determinación de la Concentracion Minima Inhibitoria (MIC) por dilución en agar. UMSA-FCFB.
- ✓ Ragusa D, Granato Cfh, Kawakami E. Evaluation of the stool antigen test for *Helicobacter pylori* in children and adolescents. Dig Dis Sci 2005; 50: 453-457.
- ✓ Ramírez A, Gilman R. *Helicobacter pylori* en el Perú. Lima-Perú. 2004. Editorial Santa Ana S.A. 276 pp.
- ✓ Ramirez P., Mercado M., Trespalacios A., Avila J., Otero W. (2012) Estado actual de la resistencia de *Helicobacter pylori* a tetraciclina: revisión sistematica de la literatura. Scielo Vol. 17 N° 2: 216-229.
- ✓ Ramírez R. Alberto, Sánchez S. Rolando. *Helicobacter pylori* 25 años después (1983 -2008): Epidemiología, Microbiología, Patogenia, Diagnóstico y Tratamiento Rev. Gastroenterol. Perú; 2009; 29-2: 158-170.
- ✓ Rappin G. Contribution a l'étude bactéries de la bouche a l'état normal et dans la fièvre typhoid. Parent, Paris, France. 1881.
- ✓ Rautelin H, Sipponen P, Seppala K, Sarna S, Danielsson D, Kosunen T. Gastric inflammation and neutrophil-activating and cytotoxin-producing *Helicobacter pylori* strains. Scand J Gastroenterol 1996;92:639-42. Medline.
- ✓ Rivas T. Francisco, HERNÁNDEZ Francisco. *Helicobacter pylori*: Factores de virulencia, patología y diagnóstico. Rev Biomed 2000; 11:187-205.



- ✓ Rudi J, Kolb C, Maiwald M, Kuck D, Sieg A, Galle P, Stremmel W. Diversity of *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genes and relationship to VacA and CagA protein expression, cytotoxin production, and associated diseases. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 944-948.
- ✓ Rudnicka A, Chimela M. Inflammation and host immune response in *Helicobacter pylori* infections. *Curr Trends Immunol* 2004; 6: 1-19.
- ✓ Safayhi H, Rall B, Sailer E y Ammon H. Inhibition of boswellic acids of human leucocyte elastase. *J of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1997;281(10):460-3.
- ✓ Salaun L And SAUNDERS NJ. Population-associated differences between the phase variable LPS biosynthetic genes of *Helicobacter pylori*. *BMC Microbiol.* 2006; 6: 79 – 90.
- ✓ Salomon H. Über das spirillum des Säugetiermagens und sein Verhalten zuden belegzellen. *Zentralbl. Bacteriol, Mikrobiol. Hyg.*1986; 19: 433.
- ✓ Sattar, a., Bankova, V., Kujumgiev, a., Galabov, A., Ignatova, A., Todorova, C., and Popov, S. (1995) Chemical composition and biological activity of leaf exudates from some Lamiaceae plants. *Pharmazie* 50, 62-65.
- ✓ Shaikh S, Khaled Ma, Islam A, Kurpad Av, Mahalanabis D. Evaluation of stool antigen test for *Helicobacter pylori* infection in asymptomatic children from a developing country using 13C-urea breath test as a standard. *J Pediatric gastroenterol Nutr* 2005; 40: 552-4.



- ✓ Sicinski L, Correa P, Bravo L And Schneider B. A positive assay for identification of *cagA* negative strains of *Helicobacter pylori*. J Microbiol Meth. 2003; 55: 625 – 33.
- ✓ Simala-Grant JI, Taylor De. Molecular biology methods for the characterization of *Helicobacter pylori* infections and their diagnosis. APMIS 2004; 112: 886-97.
- ✓ Skirrow M. B. *Campylobacter enteritis* “a new disease”. British Medical Journal. 1977; 2: 9 – 11.
- ✓ Skirrow, M.B., En *Helicobacter pylori*: Microbiología, Clínica y Tratamiento: retos para el siglo XXI, Madrid, Prous Science, 1999.
- ✓ Stebbins, G. L. Flowering plants: evolution above the species level. 1974, Arnold Press London, London, 399.
- ✓ Steel, K. J. 1961. The oxidase reaction as a taxonomic tool. J Gen Microbiol 25:297-306.
- ✓ Steer H.W. Ultrastructure of cell migration through the gastric epithelium and its relationship to bacteria. J Clin Pathol. 1975; 28: 639 – 646.
- ✓ Steven J, Czinn Md *et al.* *Helicobacter pylori* infection: Detection, investigation and management. J Pediatr 2005; 146: 21-26.
- ✓ Suerbaum S, Josenhans C. Virulence factors of *Helicobacter pylori*: implications for vaccine development. Molecular Med Today 1999;5:32-9. Medline
- ✓ Suerbaum Sebastián, Michetti Pierre. *Helicobacter pylori* La infección, N Engl J Med 2002; 347:1175-1186

- 
- ✓ Suerbaum, S., And P. Michetti. *Helicobacter pylori* infection. N. Engl. J. Med. 2002; 347: 1175 – 86.
  - ✓ Suganuma M, Kuzuhara T, Yamaguchi K, Fujiki H. Carcinogenic Role of Tumor Necrosis Factor- Inducing Protein of *Helicobacter pylori* in Human Stomach. BME. 2006; 31: 1 – 8.
  - ✓ Taylor De., Blaser Mj: The epidemiology of *Helicobacter Pylori* infection. Epidemiol rev 1991;13:42-59
  - ✓ Taylor, Dr. Leslie (2006). «Technical Data Report for Matico (Piper aduncum, angustifolium)» (PDF). Raintree Nutrition, Inc. Consultado el 29-03-2007.
  - ✓ Tokuda H, Ohigashi H, Koshimizu K y Ito Y. Inhibitory effects of ursolic and oleanolic acid on skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. Cancer Letters 1986;33:279-85.
  - ✓ Toshiro Fukui, Kazuichi Okazaki, Hiroyuki Tamaki *et al.* Immunogenetic analysis of gastric MALT lymphoma-like lesions induced by *Helicobacter pylori* infection in neonatally thymectomized mice. Laboratory Investigation 2004; 84: 485–492.
  - ✓ Trajkow D, Stardelova K, Dimitrova M, Misheuski J, Serafimoski V. *Helicobacter pylori* and gastric carcinoma. Prilozi. 2007; 28: 25-38.
  - ✓ Tsuda M. Essential role of *Helicobacter pylori* urease in gastric colonization: definite proof using a urease-negative mutant constructed by gene replacement. Eur J Gastroenterol Hepatol 1994;6:49-52.
  - ✓ Unemo M, Aspholm-Hurtig M, Ilver D, Bergstrom J, Boren T, Danielsson D, Teneberg S. The sialic acid binding SabA adhesion of *Helicobacter pylori* essential

- for nonopsonic activation of human neutrophils. *J Biol Chem* 2005; 280: 15390-15397.
- ✓ Urrunaga R., Urrunaga E. & Acurio L. “Investigación De La *Satureja Boliviana* Planta Medicinal Andina”; SITUA : Setiembre 94 - Febrero 95, Año 3 N° 5.
  - ✓ Valdivia R. Mario. Gastritis y Gastropatías. *Rev. Gastroenterol. Perú*; 2011; 31 - 1:38-48
  - ✓ Vandame, P., Falsen, E., Roussau, R., et al Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter pylori* and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. *Int J Syst Bacterio* 1991; 41: 88-103.
  - ✓ Vila r.; Milo, B. “Chemical composition of two samples of essential oil of *Satureja boliviana*(Benth) Briq. From Peru and Bolivia”. *J. Essent. Oil Res.*, 8: 307-309, 1996.
  - ✓ Vincent, V., B. A. Brown-Elliott, K. C. Jr. Jost, and R. J. Jr. Wallace. 2003. *Mycobacterium*: Phenotypic and Genotypic Identification, *In* P. R. Murray, Baron E.J., Jorgensen J.H., Pfaller M.A., and Tenover F.C. (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
  - ✓ VU, C., NG, Y. Prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease in a Singapore hospital. 2000 *Singapore Med. J.*, 41, 478-481.
  - ✓ Warren Jr, Marshall B. Unidentified curved bacillus on gastric epithelium in active chronic gastritis (Letter). *Lancet*, 1983; 1:1273.

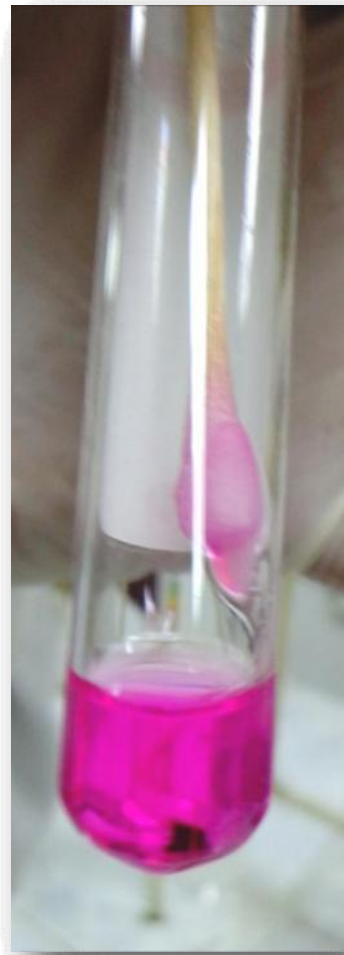
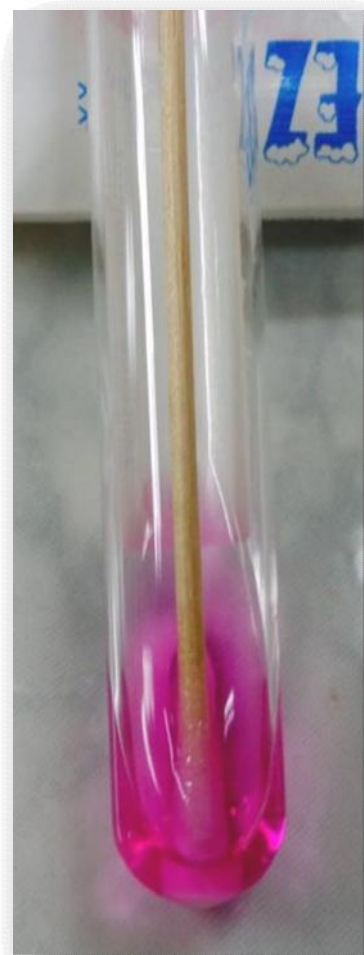
- 
- ✓ Wirh H, Yang M, Sanabria-Valentin E, Berg D, Dubois A And Blaser Mj. Host Lewis phenotype-dependent *Helicobacter pylori* Lewis antigen expression in rhesus monkeys. FASEB J. 2006; 20: 1534 – 36.
  - ✓ Yakoob J, Rasool S, Abbas Z, Jafri W, Abid S, Islam M, Ahmad Z. Gastric juice for the diagnosis of H pylori infection in patients on proton pump inhibitors. World J Gastroenterol. 2008 Mar 14; 14(10):1539-43.
  - ✓ Yamaoka Y, Kato M And Asaka M. Geographic Differences in Gastric Cancer Incidence can be explained by differences between *Helicobacter pylori* strains. Intern Med. 2008; 47: 1077 - 83.
  - ✓ Yamazaki S, Yamakawa A, Okuda T *et al.* Distinct diversity of *vacA*, *cagA* and *cagE* genes of *Helicobacter pylori* associated with peptic ulcer in Japan. J Clin Microbiol 2005; 43: 3906-16.
  - ✓ Yang Jc, Kuo Ch, Wang Hj, Wang Tc, Chang Cs, Wang Wc. Vacuolating toxin gene polymorphism among *Helicobacter pylori* clinical isolates and its association with *m1*, *m2*, or chimeric *vacA* middle types. Scand J Gastroenterol. 1998; 33: 1152 – 57.
  - ✓ Yokota S, Konno M, Mino E, Sato K, Takahashi M, Fujii N. Enhanced Fe ion uptake activity in *Helicobacter pylori* strains isolated from patients with iron deficiency anemia. Clin Infect Dis. 2008; 46: 31-3.
  - ✓ Zygadlo, J.A., E.F. Merino, D.M. Maestri, C.A Guzmán & L.A. Espinar. The essential oils of *Satureja odora* and *Satureja parvifolia* from Argentina. J. Ess. Oil Res. 1993. 5: 549–551.

**8. Anexos**

ANEXO 1: Se obtuvieron cepas salvajes de *Helicobacter pylori*, cedidas en medio de caldo urea por el laboratorio de Microbiología del Hospital Arco Iris en la gestión 2012-2013.

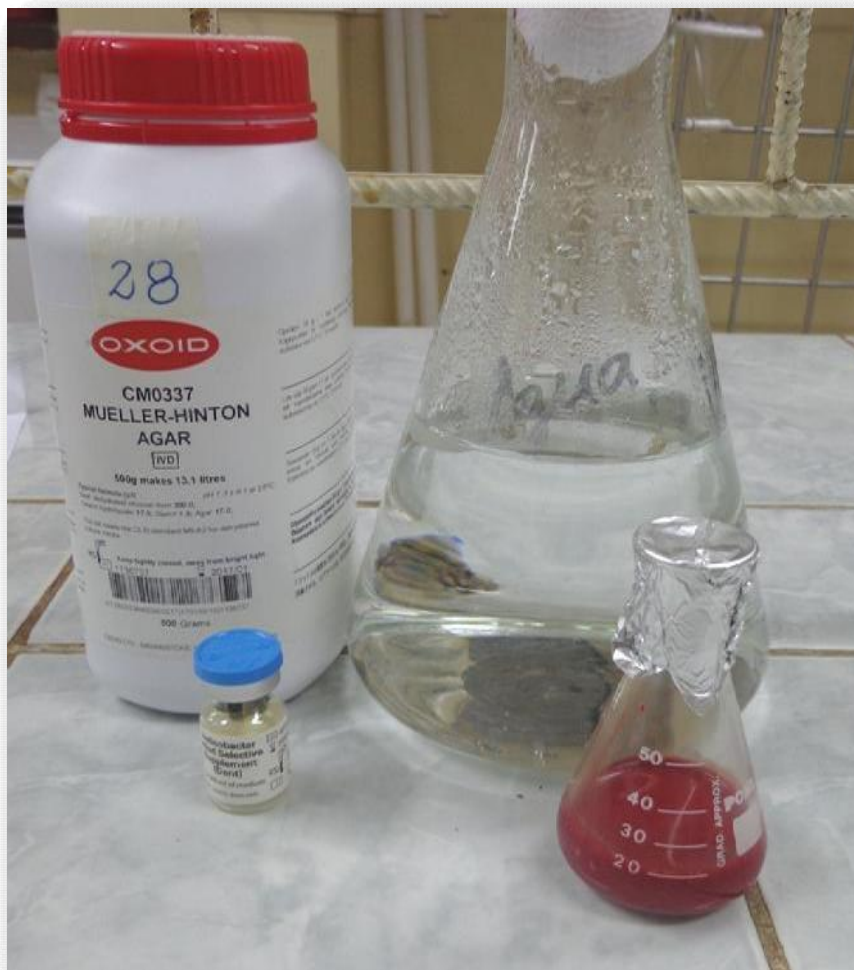


ANEXO 2: Una vez trasladadas las muestras de biopsias al laboratorio de Microbiología del Instituto de Investigación Fármaco Bioquímicas, con la ayuda de un hisopo estéril se procedió a estrujar la muestra de biopsia presionándola contra las paredes del tubo para la cual es sembrada inmediatamente en medio de cultivo.





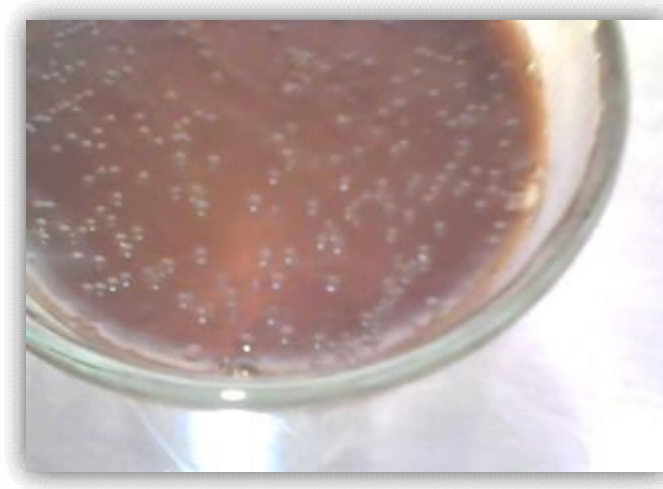
ANEXO 3: El medio de cultivo empleado es el Agar BHI (Infusión Cerebro Corazón) suplementado con 7 % de sangre de carnero desfibrinada, más *Helicobacter pylori* Selective Supplement. ( )



ANEXO 4: Las placas se incubaron en frascos de vidrio con cierre hermético por 5 días a 37°C, la atmosfera microaerofílica se generó con 2 sobres de alkaseltzer (tableta efervescente de antiácidos) colocados en un frasco con 5 ml de agua estéril y 1 vela encendida.



ANEXO 5: Se observarán colonias muy pequeñas de aproximadamente 0,5 mm de diámetro, translúcidas, transparentes y brillantes que se asemejan a gotas de rocío de agua, algunas veces se presentó como una alfombra que tapiza el medio de cultivo.



**ANEXO 6:** Análisis estadístico de la Tetraciclina en la técnica Concentración Mínima Inhibitoria por dilución en agar.

	120	60	30	15	7.5	3.75	1.87	0.94	0.47
1	S	S	S	R	R	R	R	R	R
2	S	S	S	I	R	R	R	R	R
3	S	S	S	R	R	R	R	R	R
4	S	S	S	I	R	R	R	R	R
5	S	S	S	R	R	R	R	R	R
6	S	S	S	R	R	R	R	R	R
7	S	S	S	S	R	R	R	R	R
8	S	S	S	R	R	R	R	R	R
9	S	S	S	R	R	R	R	R	R
10	S	S	S	S	R	R	R	R	R
11	S	S	S	R	R	R	R	R	R
12	S	S	S	R	R	R	R	R	R
13	S	S	S	S	R	R	R	R	R
14	S	S	S	I	R	R	R	R	R
15	S	S	S	R	R	R	R	R	R

	120 ug/ml	60 ug/ml	30 ug/ml	15 ug/ml	7,5 ug/ml	3,75 ug/ml	1,87 ug/ml	0,94 ug/ml	0,47 ug/ml
SENSIBLE	15	15	15	3	0	0	0	0	0
INTERMEDIO	0	0	0	3	0	0	0	0	0
RESISTENTE	0	0	0	9	15	15	15	15	15

**ANEXO 7:** Análisis estadístico de la Acido Ursólico en la técnica Concentración

Mínima Inhibitoria por dilución en agar.

	120	60	30	15	7.5	3.75	1.87	0.94	0.47
1	S	S	S	S	I	R	R	R	R
2	S	S	S	S	I	R	R	R	R
3	S	S	S	S	S	I	R	R	R
4	S	S	S	S	S	R	R	R	R
5	S	S	S	R	R	R	R	R	R
6	S	S	S	S	S	S	R	R	R
7	S	S	S	S	S	I	R	R	R
8	S	S	S	S	S	I	R	R	R
9	S	S	S	S	S	I	R	R	R
10	S	S	S	S	S	S	R	R	R
11	S	S	S	S	S	S	R	R	R
12	S	S	S	I	S	S	R	R	R
13	S	S	S	S	I	I	R	R	R
14	S	S	S	S	S	I	R	R	R
15	S	S	S	S	S	R	R	R	R

	120 ug/ml	60 ug/ml	30 ug/ml	15 ug/ml	7,5 ug/ml	3,75 ug/ml	1,87 ug/ml	0,94 ug/ml	0,47 ug/ml
<b>SENSIBLE</b>	15	15	15	13	11	4	0	0	0
<b>INTERMEDIO</b>	0	0	0	1	3	6	0	0	0
<b>RESISTENTE</b>	0	0	0	1	1	5	15	15	15

**ANEXO 8:** Análisis estadístico de la Acido Ursólico Acetilado en la técnica

Concentración Mínima Inhibitoria por dilución en agar.

	120	60	30	15	7.5	3.75	1.87	0.94	0.47
1	R	R	R	R	R	R	R	R	R
2	S	R	R	R	R	R	R	R	R
3	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4	S	R	R	R	R	R	R	R	R
5	R	R	R	R	R	R	R	R	R
6	R	R	R	R	R	R	R	R	R
7	R	R	R	R	R	R	R	R	R
8	S	R	R	R	R	R	R	R	R
9	R	R	R	R	R	R	R	R	R
10	R	R	R	R	R	R	R	R	R
11	R	R	R	R	R	R	R	R	R
12	R	R	R	R	R	R	R	R	R
13	R	R	R	R	R	R	R	R	R
14	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15	R	R	R	R	R	R	R	R	R

	120 ug/ml	60 ug/ml	30 ug/ml	15 ug/ml	7,5 ug/ml	3,75 ug/ml	1,87 ug/ml	0,94 ug/ml	0,47 ug/ml
<b>SENSIBLE</b>	2	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>INTERMEDIO</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>RESISTENTE</b>	13	15	15	15	15	15	15	15	15

**ANEXO 9:** Análisis estadístico de la Acido Ursólico Oxidado en la técnica Concentración Mínima Inhibitoria por dilución en agar.

	120	60	30	15	7.5	3.75	1.87	0.94	0.47
1	S	S	S	S	S	S	R	R	R
2	S	S	S	S	S	R	R	R	R
3	S	S	S	S	S	R	R	R	R
4	S	S	S	S	S	S	R	R	R
5	S	S	S	S	I	R	R	R	R
6	S	S	S	I	R	R	R	R	R
7	S	S	S	S	R	R	R	R	R
8	S	S	S	S	S	R	R	R	R
9	S	S	S	S	R	R	R	R	R
10	S	S	S	I	R	R	R	R	R
11	S	S	S	S	S	S	R	R	R
12	S	S	S	S	I	R	R	R	R
13	S	S	S	I	R	R	R	R	R
14	S	S	S	S	R	R	R	R	R
15	S	S	I	R	R	R	R	R	R

	120 ug/ml	60 ug/ml	30 ug/ml	15 ug/ml	7,5 ug/ml	3,75 ug/ml	1,87 ug/ml	0,94 ug/ml	0,47 ug/ml
SENSIBLE	15	15	14	11	6	2	0	0	0
INTERMEDIO	0	0	1	3	2	0	0	0	0
RESISTENTE	0	0	0	1	7	13	15	15	15



**ANEXO 10:** Análisis estadístico de la Aceite Esencial en la técnica Concentración

Mínima Inhibitoria por dilución en agar.

	2	1	0,5	0,25	0,13	0,06	0,031	0,02	0,008	0,004	0,002	0,001	0,0005
1	S	S	S	S	S	S	I	R	R	R	R	R	R
2	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R
3	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R
4	S	S	S	S	S	S	S	I	R	R	R	R	R
5	S	S	S	S	S	S	I	R	R	R	R	R	R
6	S	S	S	S	S	S	I	R	R	R	R	R	R
7	S	S	S	S	S	S	S	I	R	R	R	R	R
8	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
9	S	S	S	S	S	S	I	R	R	R	R	R	R
10	S	S	S	S	S	S	I	R	R	R	R	R	R
11	S	S	S	S	S	S	S	I	R	R	R	R	R
12	S	S	S	S	S	S	I	R	R	R	R	R	R
13	S	S	S	S	S	S	I	R	R	R	R	R	R
14	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
15	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R



**ANEXO 11:** Análisis estadístico del Acido Ursólico y sus modificaciones estructurales por la técnica de difusión con disco.

Compuesto mayoritario " Acido Ursolico"

Nº de muestras	Halo de inhibicion 1	Halo de inhibicion 2	Halo de inhibición 3	Promedio
Muestra 1	24,0	30,0	28,0	27,3
Muestra 2	30	33	30	31,0
Muestra 3	33	30	30	31,0
Muestra 4	36	35,8	40,1	37,3
Muestra 5	33,2	32,5	31,8	32,5

Compuesto mayoritario " Acido Ursolico Acetilado"

Nº de muestras	Halo de inhibición 1	Halo de inhibición 2	Halo de inhibición 3	Promedio
Muestra 1	24,0	45,0	28,0	32,3
Muestra 2	7	10	7	8,0
Muestra 3	10	11	11,5	10,8
Muestra 4	6	7,4	8,5	7,3
Muestra 5	10	12	11,8	11,3

Compuesto mayoritario " Acido Ursolico Oxidado"

Nº de muestras	Halo de inhibicion 1	Halo de inhibicion 2	Halo de inhibicion 3	Promedio
Muestra 1	60,0	60,0	60,0	60,0
Muestra 2	33	44	49	42,0
Muestra 3	42	47	33	40,7
Muestra 4	38	37,5	38,8	38,1
Muestra 5	49	46,5	39	44,8

**ANEXO 12:** Análisis estadístico del Aceite Esencial por la técnica de difusión con disco. Compuesto mayoritario "Aceite Esencial ( 10uL)"

Nº de muestras	Halo de inhibicion 1	Halo de inhibicion 2	Halo de inhibicion 3	Promedio
Muestra 1	60,0	59,0	58,0	59,0
Muestra 2	60	60	60	60,0
Muestra 3	60	60	60	60,0
Muestra 4	60	60	60	60,0
Muestra 5	60	60	60	60,0

Compuesto mayoritario "Aceite Esencial ( 7,5uL)"

Nº de muestras	Halo de inhibicion 1	Halo de inhibicion 2	Halo de inhibicion 3	Promedio
Muestra 1	59,0	59,0	58,0	58,7
Muestra 2	60	60	60	60,0
Muestra 3	60	60	60	60,0
Muestra 4	60	60	60	60,0
Muestra 5	60	60	60	60,0

Compuesto mayoritario "Aceite Esencial ( 5uL)"

Nº de muestras	Halo de inhibicion 1	Halo de inhibicion 2	Halo de inhibicion 3	Promedio
Muestra 1	59,0	59,0	60,0	59,3
Muestra 2	60	60	60	60,0
Muestra 3	60	60	60	60,0
Muestra 4	60	60	60	60,0
Muestra 5	60	60	60	60,0

Compuesto mayoritario "Aceite Esencial ( 2,5uL)"

Nº de muestras	Halo de inhibicion 1	Halo de inhibicion 2	Halo de inhibicion 3	Promedio
Muestra 1	59,0	59,0	60,0	59,3
Muestra 2	60	60	60	60,0
Muestra 3	60	60	60	60,0
Muestra 4	60	60	60	60,0
Muestra 5	60	60	60	60,0