

PANORAMA ACTUAL DEL ESTUDIO DE LAS PLANTAS CON ACTIVIDAD ANTI-*Helicobacter pylori*

FRANCISCO PALACIOS-ESPINOSA,

WENDY ESCOBEDO-HINOJOSA E IRMA ROMERO

Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

Av. Universidad No. 3000, Col. Universidad Nacional Autónoma de México, C.U.

Delegación Coyoacán, México D.F. 04510, México D.F. E-mail: irma@bq.unam.mx

RESUMEN

La bacteria *Helicobacter pylori* es reconocida como el principal agente causal de la gastritis crónica activa, de la úlcera péptica, así como un factor de predisposición del carcinoma gástrico. Se estima que más del 50% de la población mundial está infectada por esta bacteria y, en el caso de México, se reporta una seroprevalencia del 66%. La terapia empleada para la erradicación de la bacteria falla en más del 20%, principalmente por la generación de resistencia a los antibióticos comerciales. De tal manera, es importante controlar estas enfermedades, buscando nuevos tratamientos y/o compuestos que sean más específicos, menos tóxicos y de fácil acceso a la población.

Los productos naturales vegetales constituyen potenciales fuentes para el descubrimiento y desarrollo de nuevos agentes efectivos contra la infección de esta bacteria. En este trabajo se presenta la perspectiva actual a nivel mundial, acerca de las investigaciones que se están llevando a cabo en este campo. Se tratan temas como la evaluación preliminar de extractos de una cantidad considerable de plantas, el aislamiento de compuestos puros a partir de los extractos bioactivos, la elucidación del probable mecanismo de acción, estudios integrales que evalúan propiedades antiinflamatorias y gastroprotectoras y, por último, la modificación química de compuestos prototipo.

Palabras Clave: Antibacteriano, gastritis, *Helicobacter pylori*, plantas medicinales, productos naturales.

ABSTRACT

Helicobacter pylori is recognized as the major etiological agent of chronic active gastritis, peptic ulcer, as well as a predisposing factor in gastric carcinoma. It is estimated that over 50% of the population is infected by this bacterium and, in the case of Mexico, a 66% seroprevalence is reported. The current eradication treatment fails in more than 20% of cases, mainly due to resistance generated to commercial antibiotics. Thus, in order to control these diseases, it is important to find new treatments and/or compounds, more specific, less toxic, and easily accessible to the population.

Plant natural products are potential sources for the discovery and development of new anti-*H. pylori* agents. This paper presents the state of the art on world research in this regard. It covers topics such as preliminary evaluation of plant extracts (screenings), the isolation of pure compounds from bioactive extracts, the elucidation of the probable mechanism of action, comprehensive studies evaluating anti-inflammatory and gastroprotective properties, and finally, chemical modification of prototype compounds.

Key Words: Antibacterial, gastritis, *Helicobacter pylori*, medicinal plants, natural products.

INTRODUCCIÓN

Un descubrimiento que cimbró el ambiente científico de la medicina, la bacteriología y sobre todo de la gastroenterología fue la demostración de que en la mucosa del estómago viven bacterias que colonizan y lesionan al epitelio. Los médicos australianos Barry Marshall y Robin Warren fueron los responsables, en 1982, de identificar y cultivar una bacteria microaerófila presente en el estómago humano capaz de tolerar condiciones de pH de 2 o menos y cuya colonización y desarrollo en la mucosa gástrica, representa un factor etiopatogénico indiscutible para ocasionar gastritis, úlceras pépticas, linfoma tipo MALT e incluso ser un factor de predisposición para cáncer gástrico¹. Esta bacteria fue clasificada en 1989 como *Helicobacter pylori*².

El hallazgo mencionado, no fue aceptado fácilmente por el ambiente científico del momento, ya que, desde principios del siglo XIX, se asoció al desarrollo de la enfermedad ulcerosa péptica, factores etiológicos primarios como hipersecreción ácida y estrés (dando forma a teorías psicósomáticas) y factores secundarios como el alcohol, tabaquismo, medicamentos, alimentos irritantes, e incluso se habló por años de predisposición familiar ulcerogénica, pero nunca se había pensado en una etiología bacteriana³.

Pero los científicos australianos, no sólo dieron un papel protagónico a la bacteria, sino que también se lo dieron a la mucosa gástrica en relación a sus funciones secretoras, hormonales y nerviosas.

El establecimiento del papel de *H. pylori* fue uno de los fenómenos más importantes en las investigaciones biomédicas de los últimos años, ya que significó que esta bacteria ocupara un lugar protagónico en el interés de diversos campos de estudio: clínico, bacteriológico, epidemiológico, farmacológico, inmunológico, genético, etc., tal como lo demuestra el hecho de que al solicitar en un servidor de internet información sobre la bacteria, la respuesta sea de miles de publicaciones en los últimos 28 años, e incluso que tenga el privilegio de contar con una publicación exclusiva (*Helicobacter* <http://www.wiley.com/bw/journal.asp?ref=1083-4389>).

Actualmente se conoce que *H. pylori* es la responsable de la infección bacteriana crónica gastrointestinal más común en el mundo, estimándose que la prevalencia mundial está por arriba del 50%, y a pesar de esto, no se le ha podido considerar como parte de la microbiota habitual por el hecho de que su presencia siempre produce en los infectados una respuesta inflamatoria en grado variable, lo que representa un verdadero problema de salud.

CARACTERÍSTICAS DE *H. pylori*

H. pylori es una bacteria Gram-negativa, de forma curveada, espiral o fusiforme, mide de 2 a 4 µm de longitud y 0.5 a 1 µm de

ancho (Figura 1). Presenta de 4 a 6 flagelos unipolares de 3 µm de longitud aproximadamente; estos flagelos confieren motilidad y permiten el movimiento rápido en soluciones viscosas como la capa del moco que cubre las células epiteliales gástricas facilitando así la colonización en el estómago⁴.

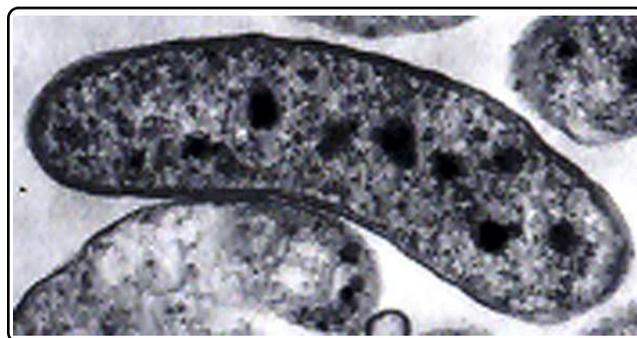


Figura 1. Micrografía electrónica de *Helicobacter pylori*.

En cultivos “viejos” o en condiciones desfavorables, *H. pylori* asume una forma cocoide, existe controversia sobre si estas formas son viables o no y se plantea que puede ser un mecanismo de resistencia, así como de transmisión de la bacteria⁴. *H. pylori* requiere de medios artificiales ricos en nutrientes como peptona, triptona, extracto de levadura, glucosa, suplementados con sangre y suero fetal bovino, es de crecimiento lento, necesitando una atmósfera microaerófila con concentraciones de O₂ de 2 a 8% y de CO₂ de 7 a 10%.

Factores de virulencia de *H. pylori*

H. pylori se ha especializado para vivir y persistir en un ambiente hostil como lo es el estómago humano, para lograr esto posee una serie de factores y mecanismos que le han permitido adaptarse exitosamente a él, los cuales se pueden clasificar en tres tipos: a) factores de colonización gástrica, b) factores involucrados en la inflamación y daño al tejido gástrico y c) factores de sobrevivencia⁵.

a) Factores de colonización gástrica. Para evadir el ambiente ácido del estómago, *H. pylori* produce una potente ureasa que hidroliza a la urea en CO₂ y amonio, neutralizando el ambiente alrededor de ella durante su colonización en el estómago. Esta actividad enzimática está altamente conservada en todas las cepas de *H. pylori*, lo que ha permitido usarla como diagnóstico. De cualquier manera la bacteria trata de minimizar el tiempo de exposición al medio ácido del lumen estomacal; gracias a la motilidad que le brindan sus flagelos, nada a través del viscoso mucus hasta alcanzar el ambiente casi neutro cercano al epitelio gástrico que es rico en nutrientes⁶. Esta propiedad también le permite a la bacteria resistir las contracciones musculares que regularmente vacían al estómago y que provocarían su salida. La mayor parte de la población de bacterias que se encuentra en el estómago está en la capa de moco y un 20% está asociada a

las células epiteliales⁶. La adhesión de *H. pylori* a la célula epitelial es un prerrequisito para iniciar los procesos de virulencia, se han descrito varias adhesinas en la membrana externa de la bacteria que interactúan con estructuras complementarias en las células del epitelio gástrico del humano, como pueden ser glicoproteínas y glicolípidos.

b) Factores involucrados en la inflamación y daño al tejido gástrico. Dentro de estos factores tenemos enzimas como la fosfolipasa A y la alcohol deshidrogenasa; así mismo, el lipopolisacárido (LPS) juega un papel importante en la inducción de una respuesta inmune, vía CD4 leucocitaria. También, se han encontrado proteínas proinflamatorias, las cuales están asociadas a la superficie y activan células inflamatorias, incluyendo macrófagos y neutrófilos⁷.

Otro factor de virulencia es la citotoxina vacuolizante (Vac A), que produce vacuolización en las células epiteliales conduciendo a la destrucción de la mucosa. Es codificada por el gen *vacA*, que está presente en todas las cepas de *H. pylori*, sin embargo, la estructura de los alelos del gen varía particularmente en dos regiones: la señal, que puede ser del tipo s1 o s2 y la media que puede ser del tipo m1 o m2. Las cepas con la combinación s1m1 han sido asociadas con mayor virulencia, aunque existen excepciones⁸.

Uno de los factores principales de daño al tejido es la isla de patogenicidad Cag-PAI, que es un conjunto de alrededor de 30 genes con un elevado polimorfismo. El 60% de las cepas de *H. pylori* producen proteínas codificadas por esta isla y se denominan como *cagA*⁺. El Sistema de Secreción tipo IV (SST4), un conjunto de proteínas codificadas por Cag-PAI es la estructura encargada de internalizar los productos bacterianos a las células epiteliales gástricas del hospedero. La proteína CagA, es sin duda una de las más importantes de la isla, induce la producción de interleucina 8 y del factor de necrosis tumoral, con la consecuente estimulación de la respuesta inflamatoria. CagA es traslocada por el SST4 a las células epiteliales infectadas donde es fosforilada, reconocida y unida a un complejo de tirosinafosfatasa que induce defosforilación en diversas proteínas de la célula y efectos múltiples como cambios en el citoesqueleto, en la motilidad y apoptosis⁸.

Las cepas *cagA*⁺ son más virulentas que las *cagA*⁻ y juegan un papel preponderante en el desarrollo de gastritis atrófica, úlcera péptica y cáncer gástrico. La presencia de *vacA* y *cagA*⁺ en una cepa ha mostrado ser la combinación más patogénica⁸.

c) Factores de sobrevivencia. La bacteria posee enzimas como la superóxido dismutasa y la catalasa que previenen la fagocitosis producto de la respuesta inmunitaria del hospedero. Por otra parte, las formas cocoides, aunque se discute acerca de su viabilidad, podrían ser una forma de resistencia para la bacteria en condiciones desfavorables.

EPIDEMIOLOGÍA

Se estima que más del 50% de la población mundial está infectada por la bacteria, sin embargo, la prevalencia de la infección depende de factores socioeconómicos y de la infraestructura sanitaria, calculándose que en países desarrollados es de 10 al 40% y esta cifra se incrementa hasta un 80 ó 90% en países en vías de desarrollo^{9,10}. En el caso de México, Torres y col. en 1998 reportan una seroprevalencia del 66% y que la infección se adquiere a edades tempranas, alcanzando un 80% en adultos jóvenes entre 18 y 20 años de edad, con una tasa de incremento del 5% anual durante los primeros 10 años de vida¹¹.

La adquisición natural de la infección por *H. pylori* ocurre principalmente dentro del núcleo familiar y es la madre quien infecta al hijo en los primeros años de vida, aunque también se puede dar por el contacto con otras personas. La ingestión parece ser el medio más probable de adquirir a la bacteria y puede alcanzar la cavidad bucal vía: gastro-oral, fecal-oral u oral-oral¹².

ENFERMEDADES ASOCIADAS A *H. pylori*

Una vez que la bacteria coloniza la mucosa gástrica permanece por años e incluso por décadas, en la mayoría de los casos, con mínima sintomatología para el paciente.

La gastritis es el daño básico que media la infección por *H. pylori*, la cual está asociada a mecanismos inmunes, humorales y celulares, provocando la inflamación de la mucosa gástrica. Recientemente, se han agrupado las diferentes patologías en tres fenotipos gástricos principales⁶. El primer fenotipo, y el más común, es “la gastritis simple”, caracterizada por una pangastritis suave con secreción ácida normal, aunque con una concentración alta de gastrina en suero. Este fenotipo es común en sujetos asintomáticos y en aquéllos que no desarrollan una enfermedad gastrointestinal seria. El segundo fenotipo es la “úlcera péptica”, presente en alrededor del 15% de los pacientes infectados. Se caracteriza por gastritis antral, gastrina elevada y secreción ácida con problemas en su regulación. La combinación de estas anomalías contribuye al desarrollo de las úlceras pépticas (gástricas y duodenales). Se ha asociado a *H. pylori* con el 95% de las úlceras duodenales y con el 85% de las gástricas. El tercero y más grave de los fenotipos es el “cáncer gástrico”, afecta aproximadamente del 1 al 2% de los sujetos infectados y está caracterizado por un patrón de gastritis crónica predominantemente del corpus, gastritis atrófica multifocal y tanto hipo, como aclorhidria. Se presentan niveles altos de gastrina y una baja relación de pepsinógeno I/II. El adenocarcinoma se desarrolla de una secuencia de lesiones que incluyen la inflamación crónica no atrófica, gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal, displasia y carcinoma. Se ha observado que los sujetos que desarrollan úlceras pépticas no llegan a presentar cáncer gástrico, lo que indica caminos divergentes en estas patologías^{6,13}.

El cáncer gástrico ocupa a nivel mundial el segundo lugar dentro de la mortalidad por cánceres (www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html) de ahí, que la asociación entre cáncer gástrico y *H. pylori* provocara gran interés cuando la Organización Mundial de la Salud, clasificó a esta bacteria como un carcinógeno tipo I¹⁴. De acuerdo al último reporte de la Secretaría de Salud, del 2005, el cáncer gástrico se encuentra entre las 20 principales causas generales de mortalidad en México (dgis.salud.gob.mx).

El riesgo de desarrollar alguna de las patologías mencionadas dependerá de tres factores principalmente: a) la virulencia de la cepa o cepas de *H. pylori* que están infectando, b) la susceptibilidad genética del hospedero, incluyendo el tipo y grado de su respuesta inmunitaria a la infección y c) factores moduladores ambientales, como hábitos dietéticos, fumar, etc.⁸

TRATAMIENTO

La infección por *H. pylori* debe ser tratada con antibióticos como cualquier otra infección bacteriana. Sin embargo, con ningún antibiótico administrado por sí solo, se ha logrado una tasa significativa de erradicación, por lo que es necesario emplear dos antibióticos a los que sea susceptible la bacteria y terapias coadyuvantes como las que incrementan el pH del estómago (ya que varios de los antibióticos no son activos a pH bajo) o agentes antiseoretos del ácido estomacal, principalmente los inhibidores de la bomba de protones (IBP)¹⁵.

El tratamiento de primera elección es la "triple terapia" que está integrada por un IBP y las siguientes combinaciones de antibióticos: 1) amoxicilina + claritromicina, 2) para áreas donde se tenga reportada la resistencia a claritromicina: amoxicilina + metronidazol y 3) en casos de alergia a penicilinas: metronidazol + claritromicina. El tiempo de administración puede variar pero generalmente abarca de 7 a 14 días. Para esta terapia se reportan fallas en la erradicación de *H. pylori* en más del 20%, principalmente debida a la resistencia de la bacteria frente a la claritromicina y/o metronidazol; no obstante, en la práctica clínica, este porcentaje va en aumento¹⁶. La segunda línea de tratamiento o "terapia cuádruple", dependerá de la combinación de antibióticos utilizada inicialmente, pero generalmente este régimen está compuesto por un IBP, los antibióticos tetraciclina y metronidazol y se adicionan sales de bismuto, el tiempo de administración se puede prolongar hasta 21 días¹⁶.

En aquellos pacientes en los que la infección por *H. pylori* persiste tras un segundo curso de tratamiento, deberán realizarse pruebas de susceptibilidad a la bacteria para elegir el antibiótico a emplearse en el tercer intento de erradicación¹⁷. Los candidatos alternativos para esta tercera línea son las quinolonas (levofloxacina, moxifloxacina), tetraciclina, rifabutina y furazolidona. Otra combinación que ha sido exitosa es amoxicilina y levofloxacina o rifabutina y elevadas dosis de IBP¹⁶. Sin embargo, la prescripción de la rifabutina presenta el inconveniente

de promover resistencia a micobacterias, además de que se han reportado casos de mielotoxicidad y toxicidad ocular¹⁷, por lo que las terapias que incluyen a este antibiótico sólo deberán emplearse tras múltiples fallos previos en la erradicación cuando se administraron los otros antibióticos¹⁸ y constituirán una cuarta línea de tratamiento.

Una terapia recientemente empleada es la denominada sucesiva, cuyo fundamento es la administración de elevadas dosis consecutivas de antibióticos; la más común involucra 2 g de amoxicilina e IBP por 5 días, seguido de una triple terapia. Esta terapia ha demostrado tener tasas de erradicación mayores del 90% en Italia¹⁹.

Finalmente, hay que enfatizar que la erradicación de *H. pylori* se recomienda únicamente en pacientes con padecimientos gastroduodenales como: úlcera péptica, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa, gastritis atrófica, pacientes con familiares en primer grado que tengan antecedentes de cáncer gástrico, pacientes con deficiencia de hierro (anemia) inexplicable y pacientes con púrpura trombocitopénica crónica idiopática¹⁷.

Problemas con las terapias

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

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

La resistencia más común reportada para los antibióticos empleados en el tratamiento contra *H. pylori* se debe a mutaciones puntuales en el sitio blanco del fármaco²⁰. La resistencia emerge por presión de selección, eliminando rápidamente a las bacterias susceptibles y sólo sobreviven aquellas con la mutación que les confiere resistencia. También se han reportado resistencias farmacológicas donde las cepas son susceptibles a un antibiótico *in vitro*, pero resistentes *in vivo*¹⁹.

Las tasas de resistencia reportadas para amoxicilina y tetraciclinas son de alrededor del 5 y 4%, respectivamente¹⁹; mientras que para el metronidazol se reporta una resistencia promedio del 35%, siendo Japón el país con la menor resistencia (3%) y Kenia con la mayor (100%). Por otro lado, para claritromicina la resistencia puede ser tan baja como del 1% (Holanda) y tan elevada como del 48% (Turquía), con una media del 14%²¹. Como se aprecia, el problema en la práctica clínica radica en la resistencia a estos dos últimos antibióticos²². En México, Torres y col. reportaron una resistencia a metronidazol del 80% en 1997, Garza-González del 37.1% en el 2002 y Chihu y col., del 58% en el 2005²³. Para claritromicina se reportó una resistencia del 24%²³. En cuanto a las fluoroquinolonas, existe una tendencia creciente en la adquisición de resistencia en países como Portugal y Japón

5.3%²⁴ y 5.5%²⁵, respectivamente. Finalmente para rifampicinas, en Alemania se ha reportado un 1.4% de resistencia²⁶.

Actualmente, se recomienda que si la tasa de resistencia local a claritromicina sobrepasa el 20%, no debe emplearse este agente¹⁷. Otra observación importante respecto al metronidazol es que la resistencia a este antibiótico *in vitro* no siempre predispone a la falla del tratamiento²⁷. El uso de un esquema adecuado de erradicación de *H. pylori*, debería tener éxito en un porcentaje superior al 90%. De hecho, la Asociación Americana de Gastroenterología, recomienda utilizar en primera instancia solamente esquemas que hayan demostrado una eficacia por encima del 85%²⁸.

Los mecanismos de acción y de adquisición de la resistencia han sido descritos ampliamente y se resumen en la Tabla I.

b) Otros factores

La falta del cumplimiento adecuado de los tratamientos por parte del paciente, es un factor vital en las bajas tasas de erradicación de la bacteria. La causa de esto es la complejidad de la terapia, que involucra por lo menos 3 fármacos, administrados en repetidas dosis, durante un largo periodo de tiempo. Debido a lo anterior, se presentan efectos secundarios que, aunados a una falta de mejoría inmediata, desmotivan al paciente a continuar con la terapia. Dentro de los efectos secundarios más frecuentes se reportan la diarrea, en un 30% de los pacientes, y el mal sabor de boca¹⁹. Por otro lado, los efectos adversos más comunes son: náusea y vómito (5%), salpullido (2%), dolor de cabeza (4%), malestar o dolor abdominal (5%) y estomatitis (3%)²⁹.

Otro aspecto que no podemos pasar por alto, es la implicación económica que representa la terapia anti-*H. pylori*; por ejemplo, en México, el costo del tratamiento de primera línea oscila entre 560 y 1260 pesos, lo cual puede ser un gasto difícil de solventar, conduciendo a la evolución de la infección en padecimientos más severos como la úlcera péptica y el cáncer.

PRODUCTOS NATURALES CON POTENCIAL ANTI-*H. pylori*

Desde tiempos inmemoriales, la humanidad ha utilizado a las plantas para el tratamiento de enfermedades comunes y para procurar su salud. Hoy en día, los sistemas de medicina tradicional basados en el uso de especies vegetales gozan de un gran respeto, especialmente en países con economías emergentes donde la disponibilidad de los servicios médicos y la accesibilidad a los tratamientos alopáticos es limitada³⁰. La resistencia de los microorganismos a los antibióticos comerciales es uno de los retos más grandes que enfrentan los sistemas de salud pública del mundo, *H. pylori* no es la excepción, como ya se mencionó. En vista de la incompleta erradicación lograda por la terapia tradicional, aunada a los altos costos de estos medicamentos y los efectos secundarios provocados a los pacientes; se hace necesaria la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento de la infección³¹. Los productos naturales, específicamente los de origen vegetal, constituyen potenciales fuentes para el descubrimiento y desarrollo de nuevos agentes efectivos contra las infecciones que hoy en día resultan difíciles de tratar. Varios grupos de investigación alrededor del mundo han encontrado miles de compuestos que presentan efectos inhibitorios sobre todo tipo de microorganismos³⁰, incluyendo

Antibióticos	Tipo	Mecanismo de acción del antibiótico	Genes	Efecto de la mutación en el gen
Claritromicina	Bacteriostático	Inhibición de la síntesis de proteínas en ARN 23S	<i>rrn 23S</i>	Disminución en la afinidad del ribosoma al antibiótico
Amoxicilina	Bactericida	Inhibición de la síntesis de peptidoglicano por bloqueo de proteínas de unión a penicilina (PBP)	<i>pbp1</i> <i>hopB</i> <i>hopC</i>	Disminución en la afinidad del antibiótico a las PBP
Tetraciclina	Bacteriostático	Inhibición de la síntesis de proteínas en ARN 30S	<i>rrn 16S</i>	Disminución en la afinidad del ribosoma al antibiótico
Metronidazol	Bactericida	El antibiótico tiene que ser reducido por reductasas bacterianas para la producción de radicales libres que dañan estructuras y ADN	<i>rdxA</i> , <i>frxA</i>	Inhibición de enzimas reductoras del metronidazol
Rifampicinas	Bacteriostático	Inhibición de la ARN polimerasa dependiente de ADN (subunidad β)	<i>rpoB</i>	Disminución en la afinidad de la ARN polimerasa al antibiótico
Fluoroquinolonas	Bactericida	Inhibición de la ADN girasa (subunidad A)	<i>gyrA</i>	Disminución en la afinidad de la ADN girasa al antibiótico

Modificado de Vakil & Mégraud¹⁹.

Tabla I. Mecanismos de acción y genes involucrados en la resistencia de los antibióticos utilizados en la terapia de erradicación de *H. pylori*.

por supuesto a *H. pylori*. Dichos trabajos incluyen la evaluación de extractos íntegros de una cantidad considerable de especies medicinales, aislamiento de compuestos puros a partir de extractos bioactivos, la elucidación del probable mecanismo de acción, estudios integrales que incluyen la evaluación de propiedades antiinflamatorias y gastroprotectoras por su relación con *H. pylori* como agente causal de esos padecimientos y, por último, la modificación química de compuestos prototipo para obtener moléculas con mejores actividades anti-*H. pylori*.

En esta sección se revisarán y discutirán algunos ejemplos de estas líneas de investigación en la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas para el control y la erradicación de *H. pylori*.

Estudios preliminares de selección de especies

El primer paso para descubrir extractos y/o compuestos bioactivos, consiste en realizar pruebas a un gran número de especies para determinar su potencial antibacteriano³². Diversos grupos de investigación alrededor del mundo han iniciado este tipo de proyectos científicos basándose fundamentalmente en el criterio de selección etnomédico, en particular centrándose en sus sistemas de medicina tradicional³³⁻⁴⁰. Este tipo de estudios evalúan extractos crudos; generalmente se trata de preparaciones acuosas (infusión o decocción) y etanólicas, aunque algunas veces se utilizan disolventes más apolares.

Usualmente, los métodos que se utilizan para determinar la Concentración Mínima del extracto necesaria para inhibir el crecimiento (CMI) de *H. pylori* son variados, aunque tratan de seguir los lineamientos sugeridos por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI). Se emplean cepas de colección (ATCC) y/o cepas obtenidas de muestras clínicas de pacientes diagnosticados con la infección y se utilizan como control de referencia los antibióticos utilizados en la terapia de erradicación. En los últimos 6 años destacan las evaluaciones de especies originarias de Irán, Taiwán, China, Italia, Pakistán, Camerún³³⁻⁴⁰. En nuestro país, el cual goza de una amplia variedad de especies vegetales medicinales y de las cuales un importante porcentaje se utilizan para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales; no se habían realizado evaluaciones para la identificación de especies medicinales que pudieran constituir fuentes de nuevos agentes para el combate de la infección de *H. pylori*. El primer estudio, utilizando plantas de la medicina tradicional maya yucateca, fue realizado por Anki y col.⁴¹ Posteriormente, nuestro grupo de trabajo se ha avocado a la evaluación de más de 53 plantas medicinales mexicanas útiles en el tratamiento de padecimientos gastrointestinales. Los resultados obtenidos han permitido identificar varias especies con un alto potencial para inhibir el crecimiento de *H. pylori* y que actualmente están siendo estudiadas para establecer a los principios antibacterianos^{42,43}.

En esta primera estrategia, por lo general los resultados sólo indican la concentración con la que los extractos inhiben el

crecimiento de la bacteria *in vitro* y no dan detalle acerca de si son bactericidas o bacteriostáticos. La actividad de los extractos se reporta clasificándolos como activos, moderadamente activos, con baja actividad o sin actividad y normalmente sólo hay unos cuantos que son muy activos, mientras que la mayor parte de los estudiados resultan moderadamente eficientes en su acción.

Este primer tamizaje de extractos es muy importante, ya que sienta las bases para la realización de estudios fitoquímicos con la intención de identificar a los compuestos bioactivos.

Compuestos aislados de plantas con actividad anti-*H. pylori*

A partir de los estudios fitoquímicos biodirigidos se han identificado muchos compuestos con una destacable actividad anti-*H. pylori in vitro*. Kawase y Motohashi⁴⁴, realizaron una revisión exhaustiva, hasta marzo de 2003, de compuestos aislados derivados de plantas; posteriormente, una actualización hasta el 2007 fue realizada en nuestro país por Castillo-Juárez y Romero⁴⁵.

Se ha reportado una gran variedad de compuestos con actividad anti-*H. pylori in vitro*, destacándose flavonoides, taninos, cumarinas, terpenos, quinolonas, alcaloides. Sin embargo, sólo a muy pocos de ellos se les ha demostrado que mantienen su actividad *in vivo*. Dentro de los compuestos que cumplen con este requisito se encuentran: las catequinas, en particular la epigallocatequina galata⁴⁶, el terpeno plaunotol⁴⁷, las quinolonas 1-metil-2-[(Z)-8-tridecenil]-4-(1H)-quinolona y el 1-metil-2-[(Z)-7-tridecenil]-4-(1H)-quinolona⁴⁸, el flavonoide kamferol y el alcaloide triptantina⁴⁹ y el sulforofano⁵⁰ (Figura 2).

Estudios integrales

Antes del descubrimiento de *H. pylori* como el principal agente etiológico de la gastritis y la úlcera péptica, se creía que estas patologías se debían, entre otras cosas, al exceso de acidez provocado por el estrés, ingesta de alcohol, irritantes y algunos medicamentos, por lo que los estudios con plantas se enfocaban únicamente a determinar su potencial anti-ulceroso o antiinflamatorio utilizando modelos animales donde el daño era producido por métodos químicos o físicos.

Actualmente conocemos la estrecha relación entre estas enfermedades y la infección con *H. pylori*; por lo que el enfoque actual pretende complementar la información de las propiedades antiinflamatorias y/o gastroprotectoras de agentes derivados de plantas con la actividad antibiótica, tratando de llegar a una perspectiva integral de la problemática.

Este tipo de enfoque es relativamente reciente, destacándose los estudios realizados en Brasil⁵¹⁻⁵⁶, en los que evaluaron las actividades gastroprotectoras, cicatrizantes del tejido gástrico y anti-*H. pylori* de 7 especies medicinales muy apreciadas en ese

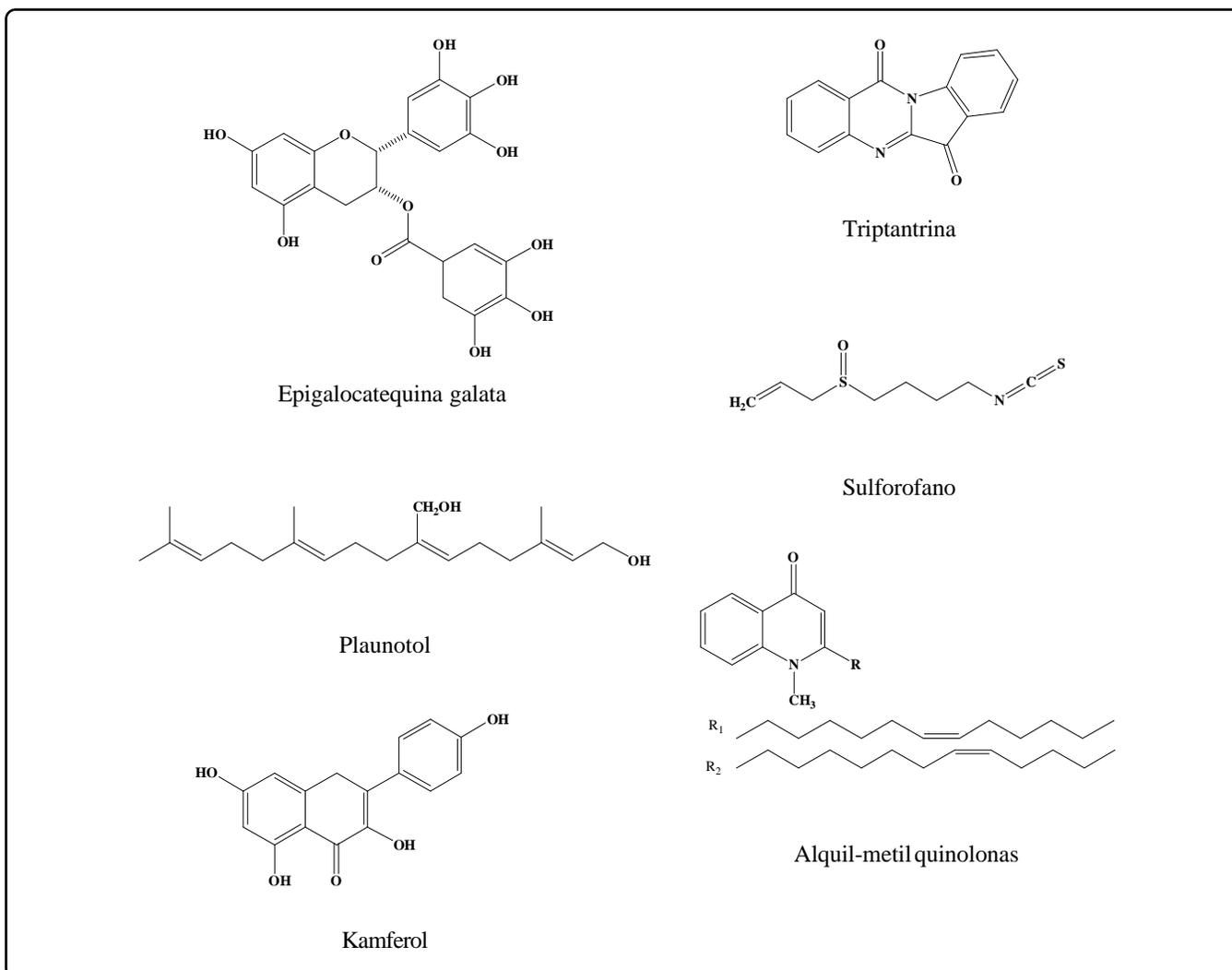


Figura 2. Compuestos selectos aislados de plantas medicinales con actividad anti-*H. pylori* *in vitro* e *in vivo*.

país. Las conclusiones de estos estudios indicaron que la eficacia terapéutica de esas especies se debe a la contribución de varios efectos farmacológicos. Por otra parte, un estudio sobre un compuesto aislado realizado en Corea del Sur, reporta la actividad antiinflamatoria de la mucosa gástrica y anti-*H. pylori* de la trifolirizina, aislada de la especie *Sophora flavescens*, empleada en el tratamiento de úlceras de las mucosas y la piel, diarrea e inflamación, entre otros padecimientos⁵⁷. Finalmente, cabe mencionar que en los estudios más completos se incluye la evaluación de toxicidad aguda y mutagenicidad, en función de establecer antecedentes sobre la inocuidad de las plantas para consumo humano^{51,52,54,56}.

Los estudios de gastroprotección y antiinflamatorios se pueden abordar con ensayos *in vivo* o *in vitro*. Dentro de los primeros, el modelo de gastroprotección más frecuente es el de úlcera aguda inducida por un agente injurante, principalmente por

etanol. En cuanto a las pruebas anti-inflamatorias, los modelos más comunes son aquéllos que producen la formación de un edema (por ejemplo, la administración de ésteres de forbol o carragenina). Estos modelos *in vivo* y sus posibles variaciones, nos permiten determinar un efecto general de los agentes derivados de la planta y una aproximación a su posible mecanismo de acción⁵⁸. Por otra parte, modelos *in vitro*, como la actividad antioxidante, inhibición de mediadores proinflamatorios o actividad antiquimiotáctica, nos dan información más precisa del mecanismo de acción.

Un punto que ha causado controversia es que el tipo de modelos biológicos empleados para determinar las actividades antiinflamatorias y/o gastroprotectoras, por lo general, no involucra la infección por la bacteria como la causa del daño gástrico o de la inflamación, sino a otros factores como agentes injuriantes o edematogénicos. Si bien, este tipo de modelos no

refleja las condiciones exactas de las patologías inducidas por *H. pylori*, permiten inferir a través de qué mecanismo actúan las plantas o los compuestos, para posteriormente realizar estudios más específicos o bien en un modelo animal de infección por *H. pylori*.

Modelos animales de infección por *H. pylori*. El desarrollo de modelos animales para la infección por *H. pylori* ha evolucionado mucho en los últimos años. Existen varios modelos en roedores, sin embargo, el implementado con gerbos (*Meriones unguiculatus*) es el más idóneo, ya que reproduce las patologías asociadas a la bacteria, como son la gastritis crónica activa, la metaplasia intestinal, las úlceras gástricas y duodenales, así como procesos cancerosos⁵⁹⁻⁶¹.

No obstante, el montaje del mismo no es fácil, de ahí que se sigan reportando los efectos de los agentes derivados de plantas bajo los modelos descritos en párrafos anteriores. Sin embargo, viene a ser un requisito indispensable si se quiere llegar a implementar algún agente derivado de plantas como terapia y/o si se quiere indagar más en el mecanismo de acción de dichos productos naturales.

Hay que hacer notar, que al igual que las terapias convencionales empleadas actualmente, ningún producto natural por sí solo ha logrado erradicar a la bacteria en este tipo de modelos, siendo necesarias terapias combinadas para lograr efectos significativos.

Mecanismo de acción

Si bien es importante aislar compuestos con actividad anti-*H. pylori* a partir de productos naturales, que puedan ser usados como nuevos fármacos para controlar la infección, el entender el mecanismo por el que actúan dichos compuestos es crucial para diseñar terapias más efectivas y evitar la generación de resistencias.

No obstante, aún no hay trabajos que analicen el mecanismo fino por el cual algún compuesto o producto derivado de plantas ejercen su acción, tal como los que se han hecho para los antibióticos comerciales. Los esfuerzos para lograr la elucidación se han centrado en estudiar su efecto sobre enzimas clave del metabolismo o sobre factores de virulencia de la bacteria.

Por ejemplo, Xiao y col. han descrito que los derivados polifenólicos del tipo de las isoflavonas inhiben la actividad ureasa de la bacteria⁶². Otros trabajos han demostrado el efecto inhibitorio de polifenoles procedentes de las brácteas del lúpulo, ricos en catequinas de alto peso molecular, sobre la toxina Vac A; se ha propuesto que el mecanismo de acción es a través de la formación de agregados con la toxina que previenen la interacción con su receptor y, por lo tanto, la internalización a la célula hospedera⁶³.

En otros casos, se ha estudiado el efecto de algunos compuestos

como las quinolonas sobre la síntesis del ADN bacteriano al actuar sobre la ADN girasa, la ADN topoisomerasa IV y sobre procesos básicos para la síntesis de energía como la cadena respiratoria^{48,64}.

También se han estudiado los efectos de compuestos como las catequinas, sobre procesos generales como el daño a la membrana y sobre la motilidad^{46,65}.

La adhesión bacteriana, mediada por interacciones carbohidrato-carbohidrato, es uno de los eventos cruciales para que la infección se lleve a cabo. Debido a esto, se ha especulado que moléculas o extractos ricos en compuestos poliméricos (taninos, antocianidinas y polifenoles de peso molecular alto), podrían constituir metabolitos idóneos para el desarrollo de nuevas terapias⁶⁶.

Ejemplos de estos estudios son los reportes del efecto inhibitorio del plaunotol⁶⁷, de fracciones de polisacáridos obtenidas del ginseng o de la *Artemisia capillaris*⁶⁸, y más recientemente del extracto (rico en ácidos urónicos y libre de catequinas) del té verde (*Camellia sinensis*)⁶⁹ y la fracción rica en polisacáridos de la sábila (*Aloe vera*)⁷⁰, sobre la adhesión de *H. pylori* a las líneas celulares gástricas (AGS y MKN85).

Tomando en cuenta el creciente desarrollo de resistencia a los antibióticos comerciales, el uso de compuestos que usen como blanco los factores de colonización, en particular los anti-adhesivos, son una perspectiva muy importante para la profilaxis de la infección, ya que al prevenir la invasión por la bacteria, se reducen los costos por tratamientos y se evita la generación de resistencias bacterianas.

Síntesis de productos con actividad anti-*H. pylori* a partir de compuestos prototipo

Otra estrategia para la obtención de nuevos compuestos con actividad contra la bacteria es la modificación química de moléculas líderes.

Una vez que se ha detectado que algún compuesto o familia de compuestos presentan excelente actividad anti-*H. pylori* y que su estructura tiene correlación con dicho efecto, surge el interés de la química medicinal en modificar a esa molécula, con la finalidad de mejorar sus propiedades antibacterianas, disminuir su toxicidad y/o mejorar sus propiedades farmacocinéticas.

Un estudio que ejemplifica esta estrategia es el trabajo de Chimenti y col., que describe la síntesis y evaluación *in vitro* de varios compuestos de tipo 2-oxo-2H-cromeno-3-carboxamida, tomando como esqueleto base o líder el de las cumarinas; un grupo de productos naturales de origen vegetal. Los resultados encontrados mostraron que la presencia de grupos funcionales acilo, éster o cloruro de acilo en la posición tres del grupo benzamida y un halógeno en la posición seis del anillo cumarina,

aumentaron la actividad anti-*H. pylori* en tres órdenes de magnitud⁷¹.

Por otro lado, la modificación estructural de un agente antibacteriano de la terapéutica clásica, por la adición de moléculas con ciertas propiedades farmacológicas, genera una nueva especie química que posee actividades diferentes o complementarias, como es el caso del estudio realizado por Zhu y col., donde se describe la adición de flavonoides a la molécula del metronidazol, con el objeto de generar derivados capaces de disminuir los problemas de resistencia y agregar propiedades antiinflamatorias, características atribuibles a este tipo de compuestos. El derivado con el que se obtuvieron los mejores resultados fue metronidazol-genisteína, el cual presentó una CMI 50 veces mejor a la del metronidazol y redujo los niveles de interleucina-8 en células AGS⁷².

CONCLUSIONES

Los productos naturales derivados de plantas son una fuente importante para la obtención de compuestos útiles en el tratamiento de la infección por *H. pylori* y/o las enfermedades asociadas a ésta. Dentro de las ventajas que ofrecen las plantas medicinales destaca su multifuncionalidad, lo que podría permitir, por un lado, que un solo preparado pueda ser utilizado para distintos padecimientos o que coadyuven, junto con otros fármacos ya conocidos, en el tratamiento de las enfermedades producidas por *H. pylori*. De igual forma, estas moléculas bioactivas pueden constituir la base estructural para el desarrollo de nuevos antibióticos más eficaces, menos costosos y con efectos secundarios menores que aquéllos provocados por los fármacos comerciales.

AGRADECIMIENTOS

A DGAPA-UNAM y a CONACyT que ha asignado recursos para nuestros proyectos de investigación (PAPIIT IN225711) y han dado becas al Dr. Juan Francisco Palacios y a la M. en B. Wendy Escobedo. Al Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM.

REFERENCIAS

- Marsall, B.J. & Warren, J.P. Unidentified curved bacilli in the stomach patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* **1**, 1311-1315 (1984).
- Goodwin, C.S. et al. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**, 397-405 (1989).
- Pajares, J.M. & Gisbert, J.P. *Helicobacter pylori*: its discovery and relevance for medicine. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* **98**, 770-785 (2006).
- O'Rourke, J. & Bode, G. Morphology and Ultrastructure. In: *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics. (eds. Mobley, H. L. T., Mendz, G. L. & Hazell, S. L.) 53-67 (ASM Press Washington, 2001).
- Ogura, K. et al. Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in mongolian gerbil. *J. Exp. Med.* **192**, 1601-1609 (2000).
- Amieva, M.R. & El-Omar, E.M. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterol.* **134**, 306-323 (2008).
- Falkow, S. Perspectives series: host/pathogen interactions. Invasion and intracellular sorting of bacteria: searching for bacterial genes expressed during host/pathogen interactions. *J. Clin. Invest.* **100**, 239-243 (1997).
- Atherton, J.C. The Pathogenesis of *Helicobacter pylori*-Induced Gastro-Duodenal Diseases. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **1**, 63-96 (2006).
- Pérez-Pérez, G.I., Rothenbacher, D. & Brenner, H. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* **9**, 1-6 (2004).
- Taylor, D. & Parsonnet, J. Epidemiology and natural history of *H. pylori* infections of the gastrointestinal tract. En: Blaser, M.J., Smith, P.F., Ravdin, J., Greenberg, H. & Guerrant, R.L. 551-564 (Raven Press, New York, 1995).
- Torres, J. et al. A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in México. *J. Infect. Dis.* **178**, 1089-1094 (1998).
- Mitchell, H.M. Epidemiology of Infection. In: *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics (eds. Mobley, H.L.T., Mendz, G.L. & Hazell, S.L.) 7-18 (ASM Press, Washington, 2001).
- Kusters, J.G., van Vliet, A.H. & Kuipers, E.J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 449-490 (2006).
- IARC (International Agency for Research on Cancer). Live flukes and *Helicobacter pylori*. IARC. Working group on the evaluation of Carcinogenic Risks to Human, Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks. Hum.* **61**, 1-241 (1994).
- Mégraud, F. Strategies to treat patients with antibiotic resistant *Helicobacter pylori*. *Internat. J. of Antimicrob. Agents* **16**, 507-509 (2000).
- Wannmacher, L. Review of the evidence for *H. pylori* treatment regimens. In Technical report series. pp. 33. Report of 18th expert committee on the selection and use of essential medicines. (WHO, 2011).
- Malfertheiner, P. et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* **56**, 772-781 (2007).
- Gisbert, J.P. "Rescue" regimens after *Helicobacter pylori* treatment failure. *World J. Gastroenterol.* **14**, 5385-5402 (2008).
- Vakil, N. & Mégraud, F. Eradication Therapy for *Helicobacter pylori*. Reviews in basic and clinical Gastroenterology. *Gastroenterol.* **133**, 985-1001 (2007).
- Mégraud, F. *Helicobacter pylori* and antibiotic resistance. *Gut* **56**, 1502 (2007).
- Mégraud, F. & Corti, R. Resistencia bacteriana del *Helicobacter pylori* en el mundo en el año 2009. *Acta Gastroenterol. Latinoam.* **39**, 282-290 (2009).
- Horiki, N. et al. Annual change of primary resistance to clarithromycin among *Helicobacter pylori* isolates from 1996 through 2008 in Japan. *Helicobacter* **14**, 86-90 (2009).
- Chihu, L. et al. Antimicrobial resistance and characterization of *Helicobacter pylori* strains isolated from Mexican adults with clinical outcome. *J. Chemother.* **17**, 270-276 (2005).
- Lopes, A.I. et al. Antibiotic-resistant *Helicobacter pylori* strains in Portuguese children. *J. Pediatr. Infect. Dis.* **24**, 404-409 (2005).

25. Fujimura, S. *et al.* *In vitro* activity of fluoroquinolone and the *gyrA* gene mutation in *Helicobacter pylori* strains isolated from children. *J. Med. Microbiol.* **53**, 1019-1022 (2004).
26. Glocker, E., Bogdan, C. & Kist, M. Characterization of rifampicin resistant clinical *Helicobacter pylori* isolates from Germany. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**, 874-879 (2008).
27. Rautelin, H., Seppälä, K., Renkonen, O.V., Vainio, U. & Kosunen, T.U. Role of metronidazole resistance in therapy of *Helicobacter pylori* infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 163-166 (1992).
28. Graham, D.Y. *et al.* A report card to grade *Helicobacter pylori* therapy. *Helicobacter* **12**, 275-278 (2007).
29. Ford, A. *et al.* Eradication therapy for peptic ulcer disease in *Helicobacter pylori* positive patients (rev). Cochrane Database Syst. Rev. 2006:CD003840.
30. Shahid, M. *et al.* Plant natural products as a potential source for antibacterial agents: Recent trends. *Curr. Med. Chem.* **8**, 211-225 (2009).
31. O'Connor, A., Gisbert, J. & O'Morain, C. Treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. **14**, 46-51 (2009).
32. Ghisalberty, E.L. Detection and isolation of bioactive natural products. In: Bioactive natural products: Detection, isolation, and structural determination. (eds. Colegate, S.M. & Molyneux, R.J.) 11-76 (Taylor & Francis Group, New York, 2008).
33. Nariman, F., Eftekhari, F., Habibi, Z. & Falsafi, T. Anti-*Helicobacter pylori* activities of six Iranian plants. *Helicobacter* **9**, 146-151 (2004).
34. Li, Y., Xu, C., Zhang, Q., Liu, J.Y. & Tan, R.X. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* action of 30 Chinese herbal medicines used to treat ulcer disease. *J. Ethnopharmacol.* **98**, 329-333 (2005).
35. Wang, Y.C. & Huang, T.L. Screening of anti-*Helicobacter pylori* herbs deriving from Taiwanese folk medicinal plants. *FEMS Immunol. Med. Microb.* **43**, 295-300 (2005).
36. Nostro, A. *et al.* Antibacterial effect of plant extracts against *Helicobacter pylori*. *Phytother. Res.* **19**, 198-202 (2005).
37. Zaman, R., Akhtar, M.S. & Khan, M.S. *In vitro* antibacterial screening of *Anethum graveolens* L. Fruit, *Cichorium intybus* L. Leaf, *Plantago ovata* L. Seed Husk and *Polygonum viviparum* L. Root extracts against *Helicobacter pylori*. *Int. J. Pharmacol.* **2**, 674-677 (2006).
38. Ndip, R.N. *et al.* *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of extracts of selected medicinal plants from North West Cameroon. *J. Ethnopharmacol.* **114**, 452-457 (2007).
39. Zaidi, S.F. *et al.* Bactericidal activity of medicinal plants, employed for treatment of gastrointestinal ailments, against *Helicobacter pylori*. *J. Ethnopharmacol.* **121**, 286-291 (2009).
40. Atapor, M. *et al.* *In vitro* susceptibility of the Gram negative bacterium *Helicobacter pylori* extracts of Iranian medicinal plants. *Pharm. Biol.* **47**, 77-80 (2009).
41. Ankli, A. *et al.* Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. *J. Ethnopharmacol.* **79**, 43-52 (2002).
42. Castillo-Juárez, I., Rivero-Cruz, F., Celis, H. & Romero, I. Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. *J. Ethnopharmacol.* **114**, 72-77 (2007).
43. Castillo-Juárez, I. *et al.* Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *J. Ethnopharmacol.* **122**, 402-405 (2009).
44. Kawase, M. & Motohashi, N. Plant-derived leading compounds for eradication of *Helicobacter pylori*. *Curr. Med. Chem.* **3**, 89-100 (2004).
45. Castillo-Juárez, I. & Romero, I. Plantas con actividad anti-*H. pylori*: una revisión. *Bol. Soc. Bot. Mex.* **80**, 35-61 (2007).
46. Mabe, K., Yamada, M., Oguni, I. & Takahashi, T. *In vitro* and *in vivo* activities of tea catechins against *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1788-1791 (1999).
47. Koga, T. *et al.* Effect of plaunotol in combination with clarithromycin or amoxicillin on *Helicobacter pylori* *in vitro* and *in vivo*. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**, 133-136 (2002).
48. Tominaga, K. *et al.* *In vivo* action of novel alkyl methyl quinolone alkaloids against *Helicobacter pylori*. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**, 547-552 (2002).
49. Kataoka, M. *et al.* Antibacterial action of tryptanthrin and kaempferol, isolated from the indigo plant (*Polygonum tinctorium* Lour.), against *Helicobacter pylori*-infected mongolian gerbils. *J. Gastroenterol.* **36**, 5-9 (2001).
50. Haristoy, X., Angioi-Duprez, K., Duprez, A. & Lozniewski, A. Efficacy of sulforaphane in eradicating *Helicobacter pylori* in human gastric xenografts implanted in nude mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 3982-3984 (2003).
51. Lima, Z.P. *et al.* *Byrsonima fagifolia*: An integrative study to validate the gastroprotective, healing, antidiarrheal, antimicrobial and mutagenic action. *J. Ethnopharmacol.* **120**, 149-160 (2008).
52. Moraes, T.M. *et al.* *Hancornia speciosa*: indication of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions. *J. Ethnopharmacol.* **120**, 161-168 (2008).
53. Cruz, M. *et al.* *Mouriri elliptica*: Validation of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* effects. *J. Ethnopharmacol.* **123**, 359-368 (2009).
54. Kushima, H. *et al.*, *Davilla elliptica* and *Davilla nitida*: Gastroprotective, anti-inflammatory immunomodulatory and anti-*Helicobacter pylori* action. *J. Ethnopharmacol.* **123**, 430-438 (2009).
55. Quílez, A. *et al.* Anti-secretory, anti-inflammatory and anti-*Helicobacter pylori* activities of several isolated from *Piper carpunya* Ruiz & Pav. *J. Ethnopharmacol.* **128**, 583-589 (2010).
56. Mazzolin, L.P. *et al.* *Qualea parvifolia* Mart: An integrative study to validate the gastroprotective, antidiarrheal, antihemorrhagic and mutagenic action. *J. Ethnopharmacol.* **127**, 508-514 (2010).
57. Kang, M.H. *et al.* Antigastric and anti-*Helicobacter pylori* of trifolirhizin from *Sophora radix*. *Korean J. Pharmacog.* **37**, 266-271 (2006).
58. Williamson, E., Okpako, D.T. & Evans, F.J. Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material (John Wiley and Sons, New York, 1996).
59. Watanabe, T., Tada, M., Nagai, H., Sasaki, S. & Masafumi, N. *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in mongolian gerbils. *Gastroenterol.* **115**, 642-648 (1998).
60. Ikeno, T. *et al.* *Helicobacter pylori*-induced chronic active gastritis, intestinal metaplasia, and gastric ulcer in mongolian gerbils. *Am. J. Pathol.* **154**, 951-960 (1999).
61. Nakagawa, S., Osaki, T., Fujioka, Y., Yamaguchi, H. & Kamiya, S. Long-term infection of Mongolian gerbils with *Helicobacter pylori* microbiological, histopathological, and serological analyses. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **12**, 47-53 (2005).
62. Xiao, Z.P. *et al.* Polyphenols based on isoflavones as inhibitors of *Helicobacter pylori* urease. *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 3703-3710 (2007).
63. Yahiro, K. *et al.* Inhibitory effects of polyphenols on gastric injury

- by *Helicobacter pylori* VacA toxin. *Helicobacter* **10**, 231-239 (2005).
64. Rho, T.C., Bae, E.A., Kim, D., Oh, W., Kim, B. & Lee, H. Anti-*Helicobacter pylori* activity of quinolone alkaloids from *Evodia fructus*. *Biolog. & Pharmaceut. Bulletin* **22**, 1141-1143 (1999).
65. Matsubara, S. *et al.* Suppression of *Helicobacter pylori*-induced gastritis by green tea extract in Mongolian gerbils. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **310**, 715-719 (2003).
66. Wittschie, N. *et al.* Large molecules as anti-adhesive compounds against pathogens. *J. Pharm. Pharmacol.* **59**, 777-786 (2007).
67. Takagi, A. *et al.* Plaunotol suppresses interleukin-8 secretion induced by *Helicobacter pylori*: therapeutic effect of plaunotol on *H. pylori* infection. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **15**, 374-380 (2000).
68. Lee, J.H., Park, E.K., Uhm C.S., Chung, M.S. & Kim, K.H. Inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric adenocarcinoma epithelial cells by acidic polysaccharides from *Artemisia capillaris* and *Panax ginseng*. *Planta Medica* **70**, 615-619 (2004).
69. Lee, J.H. *et al.* *In vivo* anti-adhesive activity of green tea extract against pathogen adhesion. *Phytother. Res.* **23**, 460-466 (2009).
70. Xu, C. *et al.* Anti-adhesive effect of an acidic polysaccharide from *Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.). Berger on the binding of *Helicobacter pylori* to the MKN-45 cell line. *J. Phar. Pharmacol.* **62**, 1753-1759 (2010).
71. Chimenti, F. *et al.* A novel class of selective anti-*Helicobacter pylori* agents 2-oxo-2H-chromene-3-carboxamide derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 6179-6185 (2008).
72. Zhu, H.L. *et al.* Metronidazole-Flavonoid derivatives as anti-*Helicobacter pylori* agents with potent inhibitory activity against HPE-Induced Interleukin-8 production by AGS cells. *Chem. Med. Chem.* **2**, 1361-1369 (2007).