UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y LA SALUD HUMANA

TESIS DOCTORAL

Evaluación del potencial antimicrobiano y anticancerígeno de extractos de *Hibiscus sabdariffa* en *Helicobacter pylori* y células AGS, y el desarrollo de un modelo de infección en jerbos

Para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana

PRESENTA

M. en C. Astrid Espinosa Sánchez

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Javier Castro Rosas

Pachuca de Soto, Hgo., México., agosto 2025

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Instituto de Ciencias de la Salud
School of Medical Sciences
Área Académica de Nutrición
Department of Nutrition

San Agustín, Tlaxiaca, Hgo., 26 de Agosto del 2025
Asunto: Autorización de impresión

Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado
Directora de Administración Escolar

Por este medio se informa que el comité tutorial asignado a la Mtra. Astrid Espinosa Sánchez con número de cuenta 472623, estudiante del Doctorado en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana ha terminado el trabajo de tesis titulado "Evaluación del potencial antimicrobiano y anticancerígeno de extractos de *Hibiscus sabdariffa* en *Helicobacter pylori* y células AGS, y el desarrollo de un modelo de infección en jerbos", y por lo tanto se autoriza la impresión del documento en extenso propuesto por el/la estudiante después de haber sido revisado, analizado y evaluado de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 73, VI del Reglamento General de Estudios de Posgrado. Lo anterior, en función de que, el/la estudiante realizó todas las correcciones, adiciones y/o modificaciones sugeridas por el comité en la revisión previa con fecha 26 de Agosto del 2025. Por tal motivo, solicitamos a usted tenga a bien permitir al doctorando dar continuidad al proceso necesario que conlleve a la obtención del grado de Doctor en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana.

DR. JAVIER CASTRO ROSAS
Director de tesis
DR. VICTOR MANUEL MUÑOZ PÉREZ
Codirector
DR. CARLOS ALBERTO GÓMEZ ALDAPA
Integrante comité tutorial
DR. ALBERTO NAVARRETE PEÓN
Integrante Comité tutorial

A T E N T A M E N T E
"Amor, Orden y Progreso"

M.C. ESP. JOSÉ ANTONIO HERNÁNDEZ VERA
Director del Instituto de Ciencias de la Salud

DRA. NELLY DEL SOCORRO CRUZ CANSINO
Jefa del Área Académica de Nutrición

DRA. LYDIA LÓPEZ PONTIGO
Coordinadora de Posgrado del ICSa

DRA. ESTHER RAMÍREZ MORENO
Representante del Programa Educativo ICSa

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN

Circuito ex-Hacienda la Concepción s/n Carretera Pachuca Actopan, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo, México. C.P 42172
Teléfono: 52(771)7172000 Ext. 41524 y 41528
nutricion@uaeh.edu.mx

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Instituto de Ciencias de la Salud
School of Medical Sciences
Área Académica de Nutrición
Department of Nutrition

Asunto: Publicación de artículo

MTRA. OJUKY DEL ROCÍO ISLAS MALDONADO
DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E

Por este medio se informa que **ASTRID ESPINOSA SÁNCHEZ**, estudiante del **DOCTORADO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y SALUD HUMANA**, con número de cuenta 472623 ha publicado el/los artículo(s) indizado(s):

Espinosa-Sánchez, A., Montaño-Estrada, L. F., Rendón-Huerta, E. P., Navarrete-Peón, A., Gómez-Aldapa, C. A., Muñóz-Pérez, V. M., & Castro-Rosas, J. (2024). *Hibiscus sabdariffa as a novel alternative strategy against Helicobacter pylori infection development to gastric cancer. Journal of Medicinal Food, 27*(12), 1158–1167. https://doi.org/10.1089/jmf.2024.0130 Factor de impacto (2024): 2.0

Espinosa-Sánchez, A., López-Santillán, I. C., Estefes Duarte, J. A., García-Cordero, A. L., Muñóz-Pérez, V. M., & Castro-Rosas, J. (2025, enero). *Inflammation and cancer development: Basic mechanisms and evidence of its regulation by Hibiscus sabdariffa natural extracts. The Natural Products Journal.* https://doi.org/10.2174/0122103155352510241218055748 Factor de impacto (2025): 1.2

Debido a lo anterior, la/el estudiante cumple con los requerimientos de egreso establecidos por el programa de posgrado, al contar tanto con el trabajo de tesis como con un artículo (o en su caso tres artículos) publicados(s) en una revista(s) indizada(s). Por lo que solicitamos a usted tenga a bien permitir al doctorando dar continuidad al proceso necesario que conlleve a la obtención del grado de Doctor en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana.

A T E N T A M E N T E
Pachuca, Hidalgo a 04 de Septiembre del 2025
"Amor, Orden y Progreso"

M.C. José Antonio Hernández Vera
Director del Instituto de Ciencias de la Salud
Dean

Dra. Nelly del Socorro Cruz Cansino
Jefa del Área Académica de Nutrición
Chair of Academic Area of Nutrition

Dra. Lydia López Pontigo
Coordinadora de Posgrado del ICSa
Director of Graduate Studies of ICSa

Dra. Esther Ramírez Moreno
Representante del Programa Educativo ICSa
Representative of Graduate Studies

Circuito ex-Hacienda la Concepción s/n Carretera Pachuca Actopan, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo, México. C.P.42172
Teléfono: 52(771)7172000 Ext. 41524 y 41528
nutricion@uaeh.edu.mx

Dedicatorias y agradecimientos

A Diosito y a mi madre, porque gracias a ellos he llegado a este punto de mi vida. A mi padre, por darme siempre el ejemplo de estudiar y esforzarme todo lo posible.

A André, mi regalo más preciado al término del doctorado, y a mi cora, quienes han sido mi motor en este largo viaje.

A mi hermano, cuya presencia constante me acompaña siempre.

A mis asesores, en especial al Dr. Javier Castro, quien desde el inicio confió en mí, me acompañó y continúa brindándome su apoyo. Un agradecimiento especial al Dr. Israel Castillo, que llegó en el momento justo para enseñarme y ayudarme a concluir este proceso: gracias, sensei.

A la Dra. Esme que siempre estuvo para escucharme.

A la Dra. Erika Rendón, por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme trabajar con personas tan valiosas.

A la Dra. Iris, por recibirme en su laboratorio, acompañarme y estar presente en momentos clave de este trayecto, al igual que el Dr. Diego Estrada.

A mis compañeros y amigos de laboratorio: Toño Cordero, Toño Estefes, Naresh, Brendita, Etna, Rubén, José, Ale, Ari y Zac, por hacer este camino más llevadero y ayudarme incluso más de lo que hubiera podido pedir.

A mis amigos de siempre: Anita, Christine, Fabirulis, Emma, Rahel, Norma, Axel y mamá Nora, por permanecer a mi lado en cada etapa.

Tabla de contenido

Índice de figuras **7**

Índice de tablas **9**

Resumen **10**

1. Introducción 12

1.1 La infección por *H. pylori* como precursor de lesiones premalignas a cáncer gástrico 12

1.2 Propiedades de los extractos de *H. sabdariffa* como potenciales tratamientos alternativos a la infección con *H. pylori* 17

Tabla comparativa de extractos de *Hibiscus sabdariffa* 22

1.3 Perspectiva general de reacciones metabólicas, mecanismos básicos de inflamación y cáncer ligados a los extractos de *H. sabdariffa.* 29

2. Planteamiento del problema y justificación 35

3. Objetivo 36

3.1 Objetivo General 36

3.2 Objetivos Específicos 36

4. Materiales y métodos 37

4.1 Diagrama metodológico 37

4.2 Fase 1: Obtención de los extractos de *Hibiscus sabdariffa* ... 38

4.2.1 Extractos acuoso, acetónico, etanólico, metanólico y ácido hibiscus puro de *H. sabdariffa* 38

4.3 Fase 2: Evaluación de extractos *in silico* e *in vitro* en cepa bacteriana 40

4.3.2 Inhibición bacteriana de *H. sabdariffa* 41

4.3.3.1. Ensayo de actividad ureásica 41

4.3.3 Actividad bactericida de los extractos de *H. sabdariffa* en cultivos de *H. pylori* 42

4.4 Fase 3: Evaluación de extractos *in vitro* en células AGS 44

4.4.1 Mantenimiento de células AGS 44

4.4.2 Ensayo de citotoxicidad 46

4.5 Fase 4: Modelo de infección *in vivo* en jerbos (*Meriones ungiculatus)* 48

4.6 Análisis estadístico 52

5. Resultados y discusión 52

5.1 Extractos acuoso, acetónico, etanólico, metanólico y ácido hibiscus puro a partir de las cálices de *H. sabdariffa.* 52

5.4 Actividad antimicrobiana de *H. sabdariffa* vs. *H. pylori* 54

5.6 Citotoxicidad de los extractos de *H. sabdariffa* en células AGS 63

5.6 Modelo *in vivo* para evaluación de los extractos 69

6. Conclusiones 75

7. Perspectivas del proyecto 77

8. Referencias 79

Anexos 95

Índice de figuras

Figura 1. Progresión de los mecanismos moleculares de infección de H. pylori. 1)Factores de virulencia, 2) Error de activación, 3) Inflamación crónica. 14

Figura 2. Compuestos predominantes encontrados en diferentes extractos de H. sabdariffa. Los grupos mayoritarios incluyen: antocianinas, compuestos fenólicos, ácidos orgánicos y tocoferoles. (Las estructuras fueron realizadas con Chemdraw versión 23.1.1 26

Figura 3. Mecanismos básicos de A) Inflamación, B) Desarrollo de cáncer y posibles dianas moleculares de los compuestos bioactivos de extractos de H. sabdariffa 34

Figura 4. Diagrama metodológico general 37

Figura 5. Diagrama metodológico Fase 1 38

Figura 6. Diagrama metodológico Fase 2 43

Figura 7. Diagrama metodológico Fase 3 47

Figura 8. Diagrama metodológico Fase 4 50

Figura 9. Diagrama metodológico Fase 4 51

Figura 10. Cristales obtenidos de ácido hibiscus puro por el método de cristalización 53

Figura 11. Espectro de RMN de protón de ácido hibiscus 53

Figura 12. Halos de inhibición de los extractos por técnica de pozos 55

Figura 13. Gráfica comparativa de los diámetros de los halos de inhibición 56

Figura 14. Gráfica de ácido hibiscus vs. H. pylori a diferentes concentraciones (1:10, 1:100, 1:1000, y 1:10,000) siendo 1:10 = 100mg/mL, y a pH2, pH3, pH4, pH5 y pH7.4, a una OD=550nm. 57

Figura 15. Gráfica de extracto acetónico vs. H. pylori a diferentes concentraciones (1:10, 1:100, 1:1000, y 1:10,000) siendo 1:10 = 100mg/mL, y a pH2, pH3, pH4, pH5 y pH7.4, a una OD=550nm. 58

Figura 16. Gráfica de extracto metanólico vs. H. pylori a diferentes concentraciones (1:10, 1:100, 1:1000, y 1:10,000) siendo 1:10 = 100mg/mL, y a pH2, pH3, pH4, pH5 y pH7.4, a una OD=550nm. 58

Figura 17. Gráfica de extracto etanólico vs. H. pylori a diferentes concentraciones (1:10, 1:100, 1:1000, y 1:10,000) siendo 1:10 = 100mg/mL, y a pH2, pH3, pH4, pH5 y pH7.4, a una OD=550nm. 59

Figura 18. Gráfica de extracto acuoso vs. H. pylori a diferentes concentraciones (1:10, 1:100, 1:1000, y 1:10,000) siendo 1:10 = 100mg/mL, y a pH2, pH3, pH4, pH5 y pH7.4, a una OD=550nm. 59

Figura 19. Curva de crecimiento de H. pylori ATCC 43504 en un lapso de 0 a 75 hrs expresada en UFC/mL a una D.O. 660nm 61

Figura 20. Gráfica de la inhibición bacteriana vs. H. pylori expresada en porcentaje de los diferentes extractos a concentraciones de 0.04, 0.2 y 1 mg/mL. 62

Figura 21. Se muestran las células AGS recién descongeladas (A) y las mismas células en un porcentaje de confluencia del 90% (B) para su criopreservación. 64

Figura 22. Gráfica de la viabilidad celular (%) de células AGS a partir de un tratamiento en 3 hrs con los diferentes extractos a concentraciones de 100, 20, 4 y 0.8□ /mL 65

Figura 23. Gráfica de la viabilidad celular (%) de células AGS a partir de un tratamiento en 24 hrs con los diferentes extractos a concentraciones de 100, 20, 4 y 0.8□g /mL 67

Figura 24. Primer aislamiento de H. pylori del estómago de los jerbos 72

Figura 25. Segundo aislamiento de H. pylori del estómago de los jerbos, utilizando una prueba rápida en disco de papel..... 72

Figura 26. Tercer aislamiento de H. pylori del estómago de los jerbos, utilizando una prueba rápida en disco de papel..... 73

Figura 27. Cepas H. pylori : Cepas utilizadas de H. pylori provenientes del Hospital Infantil de México Federico Gómez “HIMFG” (izquierda) y del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional “CINVESTAV” (derecha). 95

Figura 28. Ensayo MTT en células AGS. 95

Figura 29. Aprobación del proyecto in vivo por el CICUAL. 96

Índice de tablas

Tabla 1. Revisión bibliográfica de los extractos de H. sabdariffa. 18

Tabla 2 Tabla comparativa de los diferentes extractos de H. sabdariffa 22

Tabla 3. Ventajas y limitaciones del modelo en jerbos para el estudio de H. pylori 71

Resumen

El cáncer gástrico representa una de las principales causas de mortalidad por cáncer a nivel mundial, y se estima que aproximadamente el 95 % de los casos están estrechamente vinculados con una infección crónica por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), una bacteria Gram negativa que coloniza la mucosa gástrica. A pesar de que los tratamientos convencionales incluyen una combinación de antibióticos, agentes antimicrobianos e inhibidores de la bomba de protones, la creciente resistencia bacteriana a estos fármacos ha disminuido significativamente su eficacia terapéutica, generando la necesidad urgente de explorar alternativas naturales con potencial terapéutico.

En este contexto, el presente estudio tuvo como objetivo principal evaluar la actividad antimicrobiana y anticancerígena de diversos extractos de *Hibiscus sabdariffa* (acetónico, acuoso, etanólico, metanólico y ácido hibiscus puro), mediante ensayos *in vitro* sobre cepas de *H. pylori* y células cancerosas gástricas AGS, así como proponer un modelo experimental *in vivo* que permita validar su efectividad en un modelo murino de meriones unguiculatus linea Hsd: MON, machos.

Para el análisis *in vitro*, se utilizaron las cepas bacterianas *H. pylori* ATCC 700392 y ATCC 43504. Se llevaron a cabo pruebas de crecimiento bacteriano y difusión en agar mediante la técnica de pozos. Además, se evaluó la actividad ureásica a través de la hidrólisis de urea, empleando rojo de fenol como indicador, en distintos valores de pH (2, 3, 4, 5 y 7.4). Los extractos se probaron a diferentes concentraciones, partiendo de una solución inicial de 100 mg/mL, de la cual se realizaron diluciones seriadas 1:100, 1:1000 y 1:10,000.

Por otro lado, la actividad anticancerígena se evaluó en la línea celular AGS mediante el ensayo colorimétrico MTT, que permite estimar la viabilidad y proliferación celular en función de la actividad metabólica residual tras la exposición a los extractos en distintas concentraciones.

Complementariamente, se diseñó un modelo *in vivo* en jerbos de Mongolia, los cuales fueron infectados de forma experimental durante siete días consecutivos con una suspensión oral de la cepa ATCC 43504. La colonización gástrica fue confirmada mediante la prueba rápida de ureasa (PRU), y se implementó un trasplante de microbiota para incrementar la virulencia bacteriana, replicando condiciones más cercanas a la infección en humanos.

Los resultados obtenidos revelaron que el extracto acetónico de *H. sabdariffa* exhibió una actividad antimicrobiana significativa contra *H. pylori*, evidenciada por la inhibición significativa de la actividad ureásica, especialmente en concentraciones elevadas. En paralelo, el ácido hibiscus puro mostró una destacada actividad citotóxica sobre las células AGS, reduciendo su viabilidad de manera similar a agentes que inducen apoptosis, lo que refuerza su potencial como compuesto anticancerígeno natural.

En conclusión, los extractos de *Hibiscus sabdariffa*, particularmente el acetónico y el ácido hibiscus puro, emergen como prometedores candidatos para el desarrollo de terapias alternativas en el tratamiento de infecciones por *H. pylori* y en la prevención o tratamiento complementario del cáncer gástrico. No obstante, es imprescindible continuar con estudios preclínicos y clínicos para validar su eficacia, determinar su perfil toxicológico y establecer protocolos adecuados para su posible aplicación terapéutica en humanos.

1. Introducción

1.1 La infección por *H. pylori* como precursor de lesiones premalignas a cáncer gástrico

Helicobacter pylori (*H. pylori)* es un microorganismo Gram negativo con forma de hélice, de entre 0.5-1 µm de ancho, y 2-4 µm de largo. Es microaerofílico, flagelado y tiene afinidad por la región pilórica del estómago[1,2]. El riesgo de infección varía dependiendo del nivel socioeconómico del país; se estima que en Latinoamérica la infección puede alcanzar hasta el 70 %[3] de la población, mientras que a nivel mundial la prevalencia alcanza aproximadamente el 50 % [4].

La infección con *H. pylori* suele adquirirse durante la infancia, principalmente por vías fecal-oral u oral-oral[5], y puede persistir hasta la adultez, siendo asintomática y sin requerir tratamiento antibiótico, integrándose a la microbiota gástrica[4]. Aunque las vías de transmisión no están completamente esclarecidas, se presume que pueden ser de persona a persona, ya sea con miembros de la misma familia, o en la calle por contaminación ambiental[6].

Se ha documentado transmisión oral-oral por medio de saliva de una persona infectada, así como por consumo de alimentos o agua contaminada, especialmente en contextos con condiciones sanitarias deficientes, falta de acceso a agua potable o mal manejo de alimentos[6].

En términos generales, el primer paso para la colonización por *H. pylori* es la neutralización del ambiente ácido del estómago[5], mediante la expresión de ureasa, enzima que convierte la urea en amoníaco: esto eleva el pH local y permite la supervivencia bacteriana en un entorno altamente ácido[7]. Posteriormente, *H. pylori* migra al epitelio gástrico del hospedero y se une a las adhesinas babA y sabA[5]. Aunque la infección con *H. pylori* es mayormente asintomática, sin embargo, su prevalencia de infección e incidencia de desarrollar un cáncer gástrico a nivel mundial, ha disminuido de un 52.6% a un 43.9% únicamente en adultos[8], la bacteria ha sido identificada como un factor de riesgo significativo para el desarrollo de cáncer gástrico[9], siendo clasificada como un carcinógeno del grupo I para el estómago[10].

La gastritis crónica inducida por *H. pylori* está asociada con la infiltración de células inflamatorias, principalmente linfocitos, y células plasmáticas que se acumulan en altas concentraciones en la mucosa gástrica[11]. Esta respuesta se intensifica por la acción de factores de virulencia secretados por *H. pylori*[7]. Esta forma de gastritis se considera una condición premaligna, ya que la inflamación persistente, junto con factores oncogénicos bacterianos, puede favorecer la progresión hacia el cáncer gástrico[12].

El mecanismo mediante el cual *H. pylori* induce cáncer gástrico ha sido ampliamente debatido, pero actualmente se han identificado tres rutas principales:

1. La acción de dos factores de virulencia clave:
   - La citotoxina vacuolizante A (VacA), que induce vacuolas intracelulares, afecta el metabolismo, promueve apoptosis, el estrés mitocondrial, la despolarización de la membrana, la autofagia e inhibe células T[13].
   - La proteína CagA (citotoxina asociada al antígeno A), considerada oncogénica, altera los procesos de adhesión, polaridad y migración celular, así como la diferenciación [14,15].

2 La activación anómala de la vía del factor nuclear kappaB (NFκB) que regula positivamente la respuesta inmunológica inflamatoria de tipo Th1 ante patógenos[14,16].

3 La metilación anómala del ADN inducida por inflamación crónica, que puede inactivar genes supresores de tumores y aumentar la susceptibilidad al cáncer gástrico[14,17].

En conjunto, estos mecanismos evidencian la capacidad de *H. pylori* para inducir una amplia gama de respuestas celulares: inflamación persistente, disrupción de la señalización intracelular y, en contextos crónicos, aparición de neoplasias gástricas[9] (Figura 1).

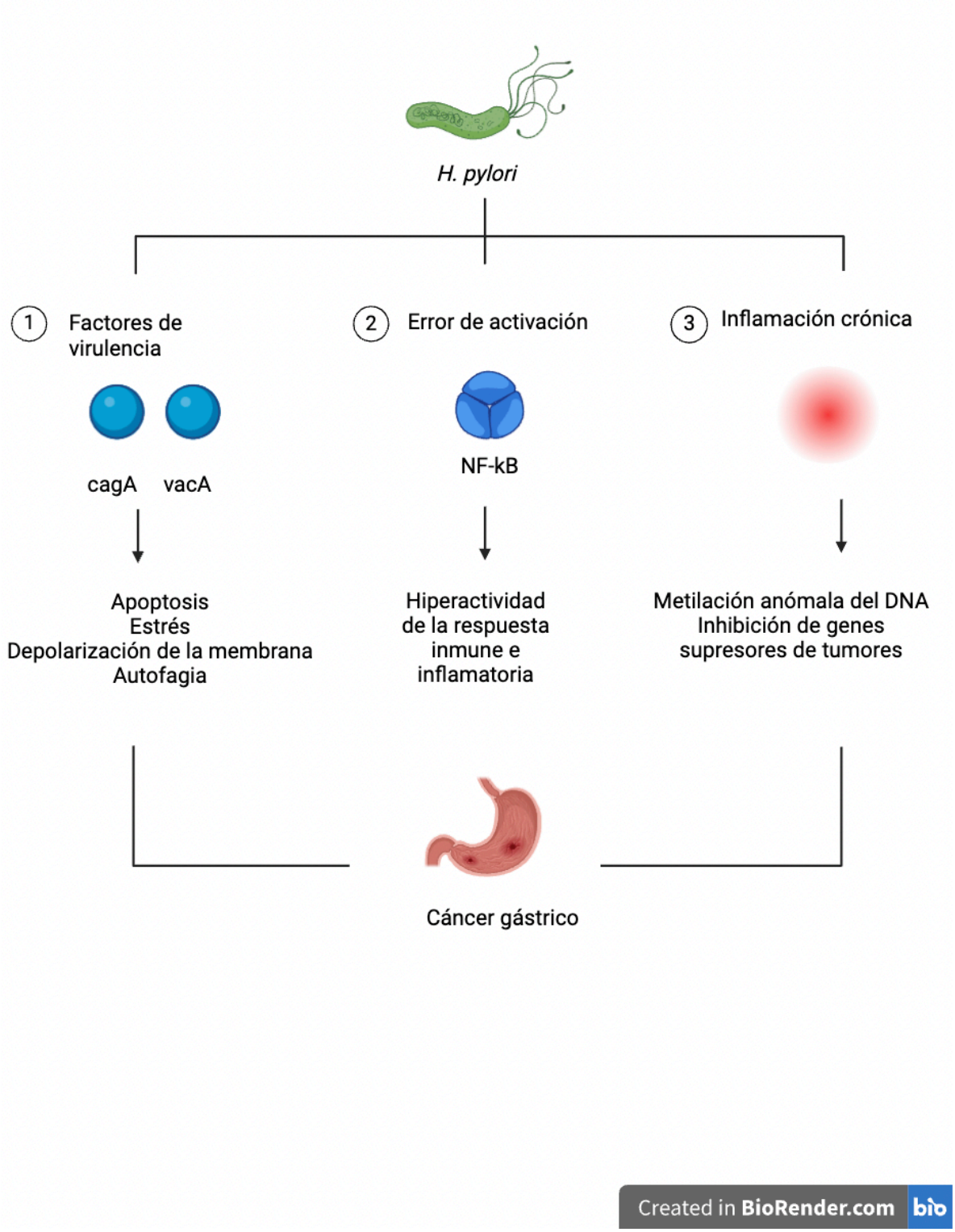


Figura 1. Progresión de los mecanismos moleculares de infección de H. pylori. 1)Factores de virulencia, 2) Error de activación, 3) Inflamación crónica.

Las úlceras pépticas pueden aparecer en caso de que el paciente infectado con *H. pylori* no reciba el tratamiento correcto para gastritis crónica, o bien, si está expuesto a diferentes factores de riesgo, por ejemplo, tabaquismo, predisposición genética a inflamación crónica, y/o abuso de la ingesta de antibióticos[18].

El desarrollo de las úlceras pépticas ocurre a partir de la inhibición de "células D" (también conocidas como células delta pancreáticas secretoras de somatostatina), ubicadas puntualmente en la porción antral de la mucosa gástrica. Éstas células están directamente involucradas en la producción de gastrina, hormona que controla la secreción ácida del estómago [19,20]. Consecuentemente, la alteración de este control puede aparecer la gastritis atrófica crónica, una condición premaligna caracterizada por la pérdida de glándulas gástricas en la porción antral, lo que conlleva a metaplasia gástrica intestinal[21], una lesión precursora del cáncer gástrico en donde el epitelio glandular es reemplazado por epitelio intestinal, y su morfología es similar a la de los enterocitos[22].

El cáncer gástrico es el quinto tipo de neoplasia más común[23] y la segunda causa de muerte por cáncer a nivel mundial[24]. Es una enfermedad que suele ser asintomática en estadios tempranos, y generalmente se diagnostica cuando ya está en una etapa avanzada[24]. Algunos de los síntomas incluyen indigestión, acidez y malestar estomacal, pérdida de apetito, vómito, diarrea o constipación, y pérdida de peso[25].

Diferentes estudios señalan que el cáncer gástrico es multifactorial, involucrando, la respuesta del huésped a patógenos oportunistas, la virulencia bacteriana y factores dietético[23]. Puntualmente, *H. pylori* tiene la capacidad de modificar el microambiente y afectar la homeostasis microbiana, incrementando la susceptibilidad a úlcera péptica y cáncer gástrico[4].

La microbiota intestinal también ha sido objeto de estudio en el contexto de la infección con *H. pylori.* Se ha observado que, en pacientes no infectados, la microbiota se compone principalmente de *Proteobacterias, Firmicutes, Actinobacterias, Bacteroidetes,* y *Fusobacterias,* tanto en adultos como en niños. Además, presenta una mayor diversidad de bacterias en comparación a la microbiota de pacientes infectados, donde predominan *Spiroquetes, Protobacterias* y *Acidobacterias*[26]. Diversos estudios coinciden en que la importancia de la microbiota radica en sus funciones esenciales para el organismo, tales como la absorción de nutrientes, el metabolismo energético, y la defensa ante patógenos[27,28]. La colonización de *H. pylori* altera este equilibrio, generando disbiosis y un daño en la barrera mucosa, lo que contribuye a aumentar las respuestas inflamatorias[28].

Los tratamientos utilizados para contrarrestar la infección y el daño gástrico ocasionado por *H. pylori* consisten, en primera instancia, en esquemas de antibióticos conocidos como terapia triple o cuádruple, que combinan claritromicina, metronidazol, y amoxicilina, pudiendo ser suplementados con levofloxacino[29]. Otros tratamientos incluyen la terapia secuencial, concomitante, terapia hibrida, altas dosis de amoxicilina, uso de vonoprazan y probióticos [30].

Sin embargo, la eficacia de estos tratamientos se ha visto comprometida por la creciente resistencia de *H. pylori* a los antibióticos, lo que ha motivado a la Organización Mundial de la Salud a incluirla en la lista de prioridad para investigación y desarrollo de nuevos tratamientos, dada su relevancia como problema de salud pública [29,30]. Ante este panorama, se han explorado terapias preventivas y alternativas. Por ejemplo, los probióticos, definidos como microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios a la salud, y que han sido propuestos como una de estas alternativas[31].

Las cepas más utilizadas incluyen *Bifidobacterium spp, Enterococcus spp, Lactobacillus spp, Saccharomyces bourlardii spp,* y *Escherichia coli*[31], estas bacterias pueden modular la respuestas inmune del huésped[32]. Por ejemplo, *L. salivarius, L. gasseri, L. casei Shirota, L. Johnsonni La1, L. rhamnosus GG* y *Saccharomyces boulardii* han demostrado reducir la inflamación inducida por *H.*

pylori, y su uso combinado con antibióticos puede potenciar la eficacia del tratamiento [33,34]. No obstante, algunos estudios advierten que, a pesar de sus beneficios, los probióticos podrían alterar la microbiota en concentraciones elevadas, y se han reportado efectos adversos ante su uso como bacteriemia, sepsis, fungemia, endocarditis, náusea, y neumonía, entre otros[35].

Uno de los recursos que están siendo explotados para la emergencia de tratamiento ante cepas resistentes a antibióticos son las plantas[36]. La mayoría de las plantas contienen compuestos bioactivos con metabolitos que actúan como fitoquímicos terapéuticos, farmacéuticos y nutracéuticos para los seres humanos[37]. Se han explorado diferentes plantas utilizadas como medicina tradicional para desórdenes gastrointestinales y heridas, entre los cuales se mencionan extractos con actividad preventiva contra *H. pylori*, como *Cleistocalyx operculatus* (una especie de árbol originaria de Asia y Australia[38], capsaicina[39], y el uso potencial como agente quimioterapéutico de *Hibiscus sabdariffa Linne (H. sabdariffa)*[40].

1.2 Propiedades de los extractos de *H. sabdariffa* como potenciales tratamientos alternativos a la infección con *H. pylori*.

H. sabdariffa comúnmente conocida como flor de jamaica[41], o “roselle plant” en inglés[42], es una planta medicinal cultivada en América Central y que pertenece a la familia *Malvaceae*[43], en donde también se encuentra la planta de algodón[44]. En México, los estados con mayor producción, en donde se cultiva un 85% de la jamaica a nivel nacional son en los estados de Guerrero y Oaxaca[45]. Actualmente se utiliza *H. sabdariffa* para diferentes aplicaciones, comercialmente resalta la importancia de la extracción preparada por decocción e infusión del cáliz que es usado para la producción de bebidas, como té, mermeladas, jugos y jarabe[43,46]. En el sector médico, las cálices secos, las semillas y las hojas se utilizan para medicina herbal o bebidas fermentadas, para utilizarla por sus propiedades diuréticas, analgésicas, antitusivas, antihipertensivas, antimicrobianas, inmunomodulatorias, hepatoprotectivas, antioxidantes y anticancerígenas [40,43,46] y en el sector industrial se ha hecho mención de la jamaica utilizada como colorante natural, y el extracto de acuoso de las hojas tienen aplicaciones biomédicas y cosmeceúticas [43,47].

La preparación de los extractos de *H. sabdariffa* comienza a partir de los componentes secos de la planta. Comúnmente, los cálices y las flores son las más usadas para extraer los compuestos, aunque, las hojas o la planta completa también han sido utilizadas (Tabla 1). Posteriormente, se prepara una mezcla con los componentes secos de *H. sabdariffa* con un solvente, el cual, puede ser agua, metanol, acetona, etil acetato o hexano. El proceso de extracción consiste en la maceración de las partes secas de la planta en los solventes mencionado, siendo estos los más usados. Sin embargo, al utilizar agua, la mezcla debe pasar por un proceso de ebullición, dado que la temperatura juega un rol importante al momento de la extracción de los compuestos bioactivos.

Tabla 1. Revisión bibliográfica de los extractos de H. sabdariffa.

Parte de la planta	Solvente	Tipo de extracción	Referencia
Flor	metanol	maceración	[48]
	etil acetato		
	acetona		
	hexano		
	agua	ebullición	
	metanol acidificado	maceración	[49]
	etil acetato	maceración	[50]
	etanol		
	n-hexano		
Cáliz	etanol	maceración	[51]
	agua	ebullición	
	etanol	maceración	[52]
	agua	ebullición	[53]
Cáliz y hojas	metanol	maceración	[54]

Numerosos estudios preliminares han documentado la obtención y caracterización de extractos de los cálices de *Hibiscus sabdariffa* mediante técnicas como la maceración y la ebullición, utilizando distintos solventes: agua, acetona, etanol y metanol [49,50,55,56,57]. Estas técnicas permiten la extracción de una variedad de compuestos bioactivos, entre los cuales destacan los flavonoides, antocianinas, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos, todos con propiedades funcionales relevantes en el ámbito nutracéutico y farmacéutico. No obstante, la obtención de ácido hibiscus en su forma pura se logra principalmente a través de la extracción con metanol, debido a su mayor eficiencia para aislar este compuesto.

La selección del solvente es una variable crítica en la efectividad del proceso de extracción, ya que determina el perfil fitoquímico del extracto resultante. El agua, por ejemplo, es ampliamente usada por su accesibilidad y seguridad, siendo capaz de extraer compuestos hidrosolubles como antocianinas, ácidos orgánicos y ciertos flavonoides. Las infusiones de cálices secos, una práctica común en la medicina tradicional, han demostrado una actividad antioxidante significativa atribuida a la presencia de delphinidina y cianidina, dos antocianinas predominantes en la planta. Sin embargo, su capacidad para extraer compuestos menos polares es limitada, lo que reduce su potencial en aplicaciones que requieren la totalidad del espectro fitoquímico.

Por otro lado, los extractos acetónicos han demostrado una mayor eficacia en la extracción de flavonoides menos polares y polifenoles, que están relacionados con actividades antimicrobianas y citotóxicas. Aunque este tipo de solvente no es apto para consumo humano, es de gran utilidad en estudios bioquímicos y farmacológicos, donde se busca una mayor concentración de compuestos con potencial terapéutico. La naturaleza semipolar de la acetona permite acceder a componentes que otros disolventes más polares, como el agua, no logran extraer eficazmente[58].

El etanol, por su parte, representa una opción intermedia y segura para aplicaciones nutracéuticas. Es capaz de extraer una amplia gama de compuestos bioactivos, incluyendo antocianinas, taninos, flavonoides y ácidos fenólicos. Además, su compatibilidad con formulaciones alimenticias lo convierte en un solvente ideal para

el desarrollo de suplementos funcionales. Investigaciones recientes han demostrado que los extractos etanólicos de *Hibiscus sabdariffa* presentan efectos antihipertensivos, hipolipemiantes y antioxidantes, los cuales han sido validados en modelos animales y humanos[38,59].

En lo que respecta al metanol, su alta polaridad lo convierte en el solvente más eficiente para la extracción de una gama más amplia de compuestos fenólicos, incluidos los responsables del color y la actividad antioxidante. Sin embargo, su uso está restringido al ámbito experimental debido a su toxicidad. Aun así, su papel en la identificación y purificación de componentes específicos como el ácido hibiscus es fundamental[60]. El ácido hibiscus, un compuesto orgánico presente en los cálices, ha sido objeto de interés por su posible actividad antimutagénica y hepatoprotectora. Su extracción con metanol permite una mayor pureza y concentración, facilitando su caracterización mediante técnicas analíticas como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), espectroscopía UV-Vis y espectrometría de masas[61].

Recientemente, también se han utilizado solventes acidificados, como soluciones diluidas de ácido clorhídrico o ácido cítrico, para estabilizar compuestos sensibles como las antocianinas durante la extracción[45]. Esta estrategia no solo preserva la integridad de los compuestos extraídos, sino que también potencia su actividad antioxidante, lo que resulta particularmente útil en formulaciones cosméticas o nutracéuticas donde la estabilidad del color y la funcionalidad son esenciales.

A nivel comparativo, los extractos acuosos son los más seguros y tradicionales, pero con alcance limitado en términos de diversidad de compuestos[62]. Los extractos acetónicos y metanólicos son potentes en términos de rendimiento fitoquímico, aunque limitados por sus restricciones toxicológicas. Los extractos etanólicos representan un equilibrio adecuado entre seguridad y eficiencia, siendo los más utilizados en investigaciones aplicadas a la salud humana. Finalmente, los extractos acidificados representan una innovación reciente para mejorar la calidad y estabilidad de compuestos clave como las antocianinas (Tabla 2).

En términos de aplicaciones, los diferentes extractos de *Hibiscus sabdariffa* tienen usos diversificados. Los extractos acuosos y etanólicos se emplean en la formulación de bebidas funcionales, cápsulas nutracéuticas y cosméticos naturales[63]. Los extractos metanólicos y acetónicos, por su parte, se utilizan principalmente con fines investigativos, especialmente en estudios de farmacología experimental, identificación de nuevos bioactivos y ensayos de citotoxicidad. El ácido hibiscus, en particular, es una molécula con potencial como biomarcador antioxidante y como principio activo en terapias orientadas a modular el estrés oxidativo celular[64].

Cabe destacar que la estandarización de los métodos de extracción y la caracterización química de los extractos son esenciales para garantizar la reproducibilidad y eficacia de los productos derivados. Esto implica no solo controlar las variables del proceso (temperatura, tiempo, proporción de solvente, pH), sino también aplicar técnicas analíticas que permitan cuantificar los principales metabolitos secundarios presentes.

Tabla 2 Tabla comparativa de los diferentes extractos de H. sabdariffa

Tabla comparativa de extractos de *Hibiscus sabdariffa*

Tipo de Extracto	Solvente Utilizado	Composición Principal	Ventajas	Actividad Biológica Destacada	Limitaciones	Aplicaciones Comunes	Bibliografía
Acuoso	Agua	Antocianinas, flavonoides hidrosolubles, ácidos	No tóxico, fácil de preparar, apto para consumo	Antioxidante, antihipertensivo, diurético	Baja extracción de compuestos lipofílicos	Bebidas, infusiones, suplementos naturales	[65,66]
Acetónico	Acetona	Polifenoles, flavonoides menos polares	Alta eficiencia para compuestos no polares	Antioxidante, antimicrobiano, potencial anticancerígeno	Solvente tóxico, no apto para consumo directo	Estudios biomédicos y farmacológicos	[59]
Etanólico	Etanol (70–95%)	Flavonoides, taninos, antocianinas, ácidos	Solvente apto para humanos, alta eficiencia de extracción	Antioxidante, antiinflamatorio, antimicrobiano	Requiere concentración/deshidratación	Nutraceuticos, farmacéuticos	[57]
Metanólico	Metanol	Fenoles totales, flavonoides	Muy eficaz en extracción de compuestos bioactivos	Alta actividad antioxidante (*in vitro*)	Tóxico, solo uso experimental	Investigación y análisis fitoquímico	[67]

Ácido	Solución ácida (ej. HCl)	Antocianinas estabilizadas	Mejora estabilidad del color y potencia antioxidante	Antioxidante, estabilizador de color, antimutagénico	Puede alterar otros compuestos; requiere ajuste de pH	Cosmética, alimentos funcionales, colorantes	[68]

H. sabdariffa es considerada un alimento con alto contenido nutricional y funcional, debido a los componentes bioactivos que la conforman[69]. Estos compuestos varían dependiendo del tipo de extracto y parte de la planta utilizada: el cáliz, flor, hojas o planta entera [46]. Los extractos de cáliz han sido ampliamente estudiados por su potencial terapéutico en el tratamiento de hipertensión, disfunción hepática y diabetes[46]; los extractos se destacan por su elevado contenido en antocianinas (compuestos con alta estabilidad, glicosilación y acilación) que exhiben actividad quimioprotectora[70], mientras que los extractos de las hojas contienen antioxidantes capaces de neutralizar radicales libres y atenuar r el proceso de oxidación celular[40].

El color rojo intenso característico de *H. sabdariffa* se atribuye a su elevada concentración de antocianinas una subclase de compuestos fenólicos[70]. En los cálices predominan la delfinidina-3-sambubiosido y la cianidina-3-sambubiosido, ambos potentes antioxidantes hidrofílicos cuya estabilidad depende del pH, temperatura, luz, estructura química y presencia de otros compuestos. Entre sus efectos bioactivos destacan las propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, anticancerígenas, hepatoprotectoras y antioxidantes [71].

Diversos estudios han evaluado la capacidad antioxidante de los extractos de *H. sabdariffa.* Subhaswaraj *et al*, (2017) identificaron cuatro fitoquímicos antioxidantes en extractos etanólicos de hojas de jamaica: alfa tocoferol (Vitamina E), el éster etílico del ácido hexadecanoico (Etil palmitato), 3,7,11,15-tetramethyl-2-hecadecen-1-ol (fitol), y 9,15 – ácido octadecadienoico, y el metil ester (Metil linolenato)[72]. Por su parte, Salazar *et al*, (2012) reportaron, mediante extracción líquida de cáliz seco, la actividad antioxidante de antocianinas como delfinidina-3-0-sambubiosido, la delfinidina-3-O-glucosido y la cianidina-3-O-sambubiosido, proponiendo su uso + como colorantes de extracto natural y concentrado antioxidante[57]. Cabe señalar que la concentración de estos compuestos varía con la parte de la planta utilizada (cáliz, semilla, hoja o tallo), siendo los extractos acuosos y metanólicos del cáliz los que presentan mayor actividad antioxidante total [56].

Entre los compuestos mayoritarios de *H. sabdariffa* destacan las antocianinas: cianidina 3-rutinósido[73], delfinidina-3-sumbubiosido[70, 74], delfinidina-3-glucosido[70,74], cianidina 3-sambubiosido[70], y cianidina 3-glucosido[59,70,74]. En cuanto a los compuestos fenólicos, se han identificado miricetina[75,76], la quercetina[77], y sus derivados como la miricetina-arabinosida, y la quercetina-sambubiosida[78]. Además, se han encontrado ácidos orgánicos como el ácido oxálico, malico, shikímico, fumárico, malico, ácido hibiscus; y, entre los tocoferoles, predominan las formas alfa y beta[43] (Figura 2).

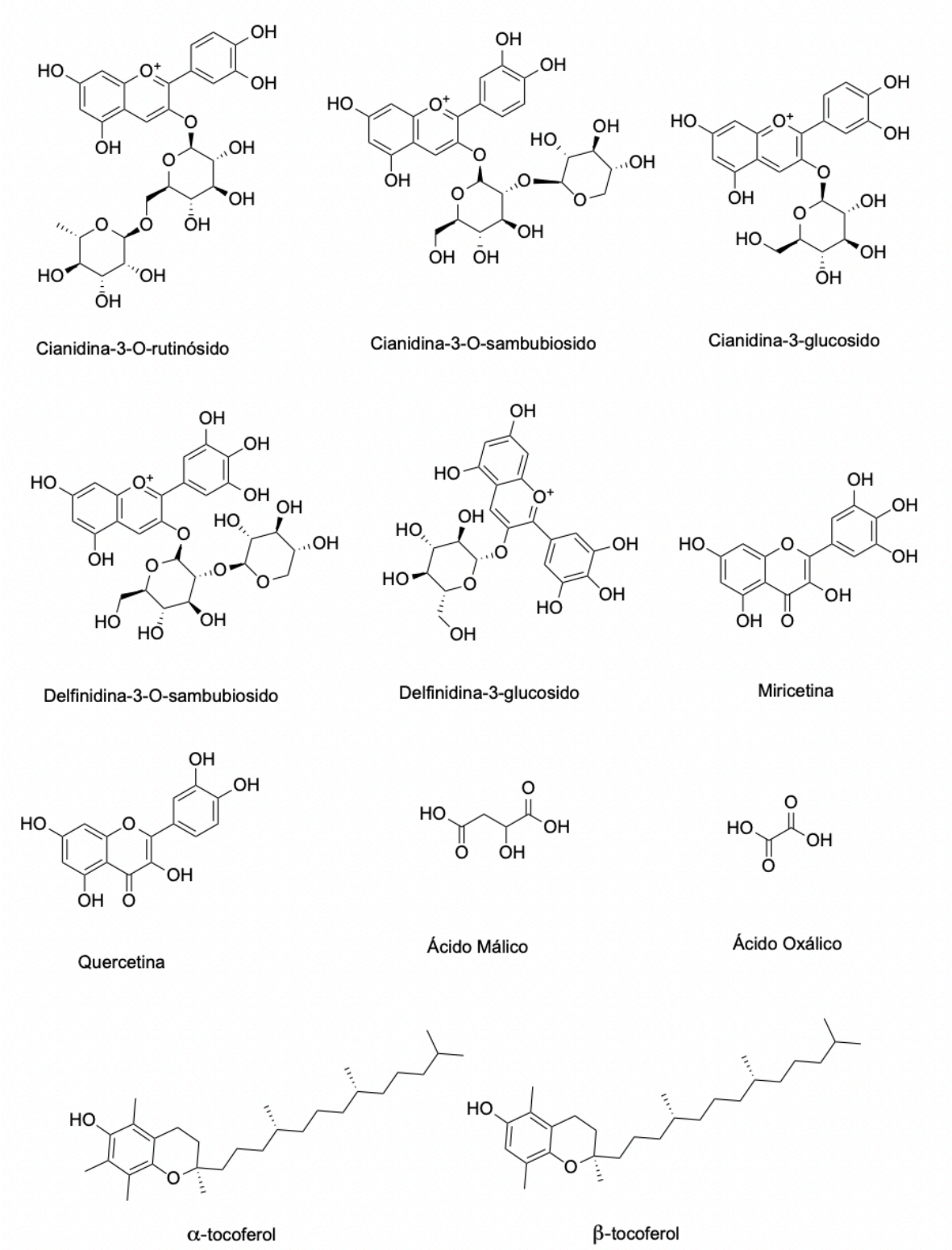


Figura 2. Compuestos predominantes encontrados en diferentes extractos de H. sabdariffa. Los grupos mayoritarios incluyen: antocianinas, compuestos fenólicos, ácidos orgánicos y tocoferoles. (Las estructuras fueron realizadas con Chemdraw versión 23.1.1

Diferentes extractos de *H. sabdariffa* se han evaluado para conocer su efecto antimicrobiano, y ha sido comparados con fármacos derivados de la penicilina. Tal es el caso de los extractos de metanol de las cálices en dónde se ha observado que tienen un potencial antibacteriano más efectivo que la gentamicina[79]. En cuanto al extracto de etanol, se ha utilizado un liofilizado de *H. sabdariffa,* en donde se demostró su actividad antimicrobiana con total inhibición de *Staphylococcus aureus* e inhibición parcial de *Escherichia coli, Bacillus cereus,* y *Listeria monocytogenes,* entre otros[80].

Portillo-Torres *et al*., (2019) investigaron el ácido hibiscus y sus fracciones cromatográficas provenientes de los cálices de *H. sabdariffa*, encontrando actividad antimicrobiana significativa frente a cepas patógenas multirresistentes [64]. Gutiérrez-Alcántara *et al*., (2016) evaluaron extractos acuosos, metanólicos, acetónicos y etil-acetato de cálices de jamaica sobre *Salmonella* resistente en zanahorias crudas. Los extractos de *H. sabdariffa* mostraron una reducción de *Salmonella* mayor que el hipoclorito, ácido acético y plata coloidal. Resulta destacable su aplicación como biocida alimentario en frutas y hortalizas, ofreciendo una alternativa natural con eficacia superior a desinfectantes convencionales [81]. Cortés-López *et al.,* (2021) exploraron *in vivo* el efecto antivirulencia del ácido hibiscus aislado en infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* en ratones. Se demostró una inhibición del quorum sensing y disminución de la virulencia bacteriana, este enfoque representa una estrategia innovadora: no matar la bacteria, sino reducir su virulencia, lo que podría retardar la aparición de resistencias [82].

A partir de estos hallazgos, se ha propuesto el uso de *H. sabdariffa* como aditivo en alimentos para evitar patógenos que pueden colonizar productos alimentarios que se consumen de manera rutinaria[80]. Asimismo, existe un estudio en el que se comparó el efecto antimicrobiano de los extractos acuoso, metanólico, etanólico, acetónico y etil acetato de *H. sabdariffa* vs. seis tipos de enjuagues bucales y clorhexidina en *Streptococcus mutans, Streptococcus sanguinis, Capnocytophaga*

gingivalis, y *Staphylococcus aureus,* en donde se obtuvo como resultado la eficacia de los extractos en todas las cepas mencionadas [55].

El efecto antimicrobiano de *H. sabdariffa* ha sido poco estudiado. Se ha evaluado la actividad del ácido protocatequico sobre *H. pylori*, y el extracto de cáliz acuoso proveniente de *H. sabdariffa,* en donde se ha reportado susceptibilidad inhibitoria *in vitro* de *H. pylori* resistente a claritromicina, y metronidazol[83]. Castillo-Juárez *et al*, (2009) reportaron el efecto *in vitro* de 53 diferentes especies de plantas usadas en la medicina tradicional mexicana para tratar desórdenes gastrointestinales sobre *H. pylori*, en donde concluyeron que los extractos acuosos y metanólicos de *H. sabdariffa* tienen efecto anti-*H.pylori*[84]*.* Hassan *et al*, (2016) reportaron el efecto sinérgico del extracto acuoso de *H. sabdariffa* en combinación con claritromicina, amoxicilina, y metronidazol contra *H. pylori,* en el cual concluyeron que el extracto acuoso de *H. sabdariffa* tiene potencial terapéutico para ser utilizado solo o en combinación como tratamiento único o complementario con antibióticos para el tratamiento de infección con *H. pylori*[62]*.* También, se ha reportado actividad antibacteriana del extracto de *H. sabdariffa,* el extracto de etil acetato de *Hibiscus rosa-sinensis L.* ante la infección con *H. pylori*, en las líneas celulares HeLa (cáncer de cérvix), Jurkat (leucemia) y MCF7 (cáncer de mama)[36]. Los resultados demostraron que la fracción del extracto EtO-Ac fue altamente bacteriostático ante cepas susceptibles y resistentes a antibióticos de *H.pylori,* y sugiere gran potencial para la prevención o tratamiento de infección con *H. pylori*[36]*.*

A través del tiempo, el daño por estrés oxidativo en el cuerpo humano comienza a tener repercusiones a nivel celular y físico. Para contrarrestar este efecto, los antioxidantes y compuestos fenólicos presentes en *H. sabdariffa* prometen una vía natural para mantener el estatus de óxido-reducción del cuerpo en homeostasis[72]. Las antocianinas, también clasificadas como flavonoides, son pigmentos solubles naturales que se pueden encontrar en *H. sabdariffa.* Sin embargo, estos compuestos son relativamente inestables, ya que se ven afectados por la temperatura, pH, oxígeno, metales, ácidos orgánicos, y azúcares presentes principalmente en la fabricación de alimentos procesados y su almacenamiento[57].

Los antibióticos son los fármacos comúnmente utilizados para tratar infecciones microbianas en el cuerpo humano. Sin embargo, la desventaja es que a través del tiempo su uso inadecuado ha perjudicado el control de infecciones debido a que muchas bacterias han mutado y presentan resistencia a antibióticos[85]. Actualmente, diferentes investigaciones se están enfocando en el desarrollo de nuevos antimicrobianos que disminuyan la tendencia de desarrollar resistencia a los antibióticos[85].

1.3 Perspectiva general de reacciones metabólicas, mecanismos básicos de inflamación y cáncer ligados a los extractos de *H. sabdariffa.*

La inflamación es un proceso natural que conlleva la activación de diferentes células como un mecanismo de defensa, en respuesta a un estímulo endógeno o exógeno, comúnmente de un tejido dañado[86,87]. Es considerado un proceso complejo porque involucra vasodilatación y el reclutamiento de células del sistema inmune y proteínas plasmáticas a la zona específica de la lesión[88]. A pesar de ser un proceso vital del cuerpo humano, cuando se torna crónico o excesivo, la inflamación puede ser responsable del desarrollo de diferentes enfermedades degenerativas, envejecimiento prematuro e incluso la muerte[89]. Las células principalmente involucradas en este tipo de inflamación son los macrófagos, ya que producen mediadores inflamatorios como el óxido nítrico (NO) y citocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF-α), interleucina (IL), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), la proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1), entre otros[90].

En cuanto a las citocinas, estas son las principales moléculas producidas por las células del sistema inmune para modular el proceso inflamatorio con la finalidad de proteger al huésped. Se clasifican en citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-15, IL-17, IL-23, TNF-α, interferón gamma (IFN-γ)) y antiinflamatorias (IL-4, IL-10, IL-13, y el factor de crecimiento transformador-beta (TGF-β)). En este contexto, el TNF juega

un papel central al promover la producción de otras citocinas y proteínas de fase aguda[90].

La vía inflamatoria de señalización mediada por TNF ocurre de la siguiente manera: el TNF, es producido por células del sistema inmune en respuesta a estímulos, como el lipopolisacárido bacteriano (LPS), el cual se une a la porción extra membranal del receptor 1 del TNF (TNFR1). Esta unión provoca un cambio conformacional en la región citosólica del receptor, que permite el reclutamiento de la proteína cinasa 1 de serina/treonina (RIPK1) y de la proteína dominio de muerte asociada a TNFR1 (TRADD). Este complejo facilita la unión del factor asociado al receptor del TNF (TRAF2), las ligasas de ubiquitina inhibidoras de apoptosis (cIAP1 y cIAP2), y un complejo de cadena lineal de ubiquitina (LUBAC)[91]. Dicha "cola de ubiquitinas": facilita 1) el reclutamiento de quinasas que activan la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y 2) el reconocimiento por el Factor Nuclear Kappa B (NFκB), un modulador esencial en la regulación de una amplia variedad de genes relacionados con la inflamación y la respuesta inmune[88], [92].

La vía canónica de activación de NF-κB por TNF comienza con la unión de NEMO a la porción citosólica de TNFR, como consecuencia de la interacción con su ligando[93]. Posteriormente, NEMO activa a IKKα e IKKβ, formando un complejo que, al ser activado por la proteína cinasa TAK1, bifosforila al inhibidor IκB. Esto permite la liberación de NF-kB que transloca al núcleo y activa la transcripción de genes proinflamatorios[94], como IL-1β, IL-6, IL-12, TNF-α y ciclooxigenasa 2 (COX-2)[88]. Sin embargo, existe una vía alternativa no canónica que depende de la cinasa inducida por NFκB (NIK), la cual activa NFκB mediante la fosforilación de IKKα,[92, 93].

La ciclooxigenasa es una enzima clave en la inflamación porque cataliza la producción de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico (AA) [94,95]. Ante un estímulo lesivo, como una herida o invasión microbiana, el AA es liberado desde los fosfolípidos de membrana por la acción de la fosfolipasa A2 (PLP-A_2), y transformado por COX a prostaglandina H_2 (PGH_2), precursora de cinco componentes principales de la inflamación: prostaglandina E_2 (PGE_2), prostaciclina

I_2 (PGI_2), prostaglandina D_2 (PGD_2), prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PG_{2\alpha}$) y tromboxano A_2 (TXA_2)[87]. Así, la producción de prostaglandinas y el grado de inflamación depende directamente de la abundancia de COX. Por lo tanto, diferentes compuestos, tanto sintéticos como naturales (incluidos extractos de *H. sabdariffa*) han sido evaluados por su capacidad de inhibir la producción o actividad de COX. Si muestran efectos positivos, se proponen como alternativas terapéuticas para tratar síntomas inflamatorios, como el dolor, fiebre y reacciones anafilácticas, directamente relacionadas con la actividad de PGE_2.

Otras vías inflamatorias mediadas por TNF, LPS, IL-1β, o estrés oxidativo, incluyen la familia MAPK[93], la cual comprende las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), p38 MAP y las quinasas c-Jun N-terminal (JNK)[96,97].

A partir de la inducción de MAPKs y la proteína quinasa activada por mitógenos y estrés (MSK), p38 está involucrado en la activación de diferentes factores de transcripción relacionados al proceso inflamatorio, como la proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (AMPc), (CREB), y la subunidad p65 del NFκB[98]. Así mismo, la activación de MAPK en macrófagos favorece la producción de mediadores de inflamación, como la óxido nítrico sintasa (iNOS), y citocinas[90]. Las enzimas de iNOS producen óxido nítrico (NO) a partir de L-arginina al sitio de daño[90,96]. El NO es un potente vasodilatador que participa en procesos inflamatorios mediante mecanismos aún no completamente dilucidados, pero su actividad se ve influenciadapor superóxido, y las especies reactivas de oxígeno (ROS) las cuales también activan vías inflamatoria y afectan la quimiotaxis celular [99,100], (Figura 3).

En cuanto a la vía de inflamación sobre la cual actúa *H. sabdariffa* se ha propuesto que inhibe la inducción de ciclooxigenasa 2 (COX-2), una enzima relacionada con la síntesis de prostaglandinas y con la progresión del cáncer debido a su papel en la tumorigénesis [101]. Se sugiere que esta inhibición afecta la vía de p38/MAPK implicada en la transducción de señales de estrés, y cuya actividad puede tener efectos tanto supresores como promotores de tumores, dependiendo del contexto[102,103].

Izquierdo-Vega, *et al* (2020)[45] reportaron una tabla con efectos terapéuticos y concentraciones de compuestos bioactivos de diferentes extractos de *H. sabdariffa* (acuoso, etanólico, metanólico). Entre los más abundantes destacan: *delfinidina-3-sambubiosido, Cianidina-3-sambubiosido, ácido cafeoilquínico, quercetina, ácido hibiscus, quercetina-3-sambubiosido* y el *ácido protocatecuico.* Estos compuestos coinciden con lo reportado por Laskar *et al* (2020)[40] quienes además muestran sus estructuras químicas y destacan sus propiedades anti-cancerígenas potenciales. La *delfinidina-3-sambubiosido* puede inducir apoptosis en modelos celulares de leucemia*;* l*a epicatequina galato* promueve autofagia*,* y el *ácido protocatecuico* actúa como un potente antioxidante e inductor de apoptosis. La *hibiscetina* inhibe el receptor 2 del factor vascular de crecimiento endotelial por sus siglas en inglés (VEGFR-2) implicado en angiogénesis[40,104].

Un modelo propuesto sobre el mecanismo proapoptótico de *H. sabdariffa* en células cancerosas, considera fracciones especificas obtenidas de extractos puros como el ácido protocatecuico y la delfinidina-3-sambubiosido, que responden a niveles elevados de estrés y especies reactivas de oxígeno, activando vías tanto intrínsecas como extrínsecas relacionadas con p53 y JNK/p38. En cuanto a la metástasis, se ha observado una disminución de la actividad de VEGF, NF-κB; en autofagia, un incremento de PI3K/Akt/Beclin-1; y en angiogénesis, una inhibición de VEGFR2, MMP-2 y RAGE[40].

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, lo que lo convierte en un problema de salud pública importante[105]. Las terapias actuales incluyen cirugía, quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia[106]. Sin embargo, estas estrategias carecen de especificidad para las células cancerosas y afectan también a las células sanas, generando efectos secundarios no deseados. Al tratarse el cáncer de un trastorno multifactorial caracterizado por replicación celular descontrolada, evasión de apoptosis, angiogénesis y capacidad de diseminación, el desarrollo de terapias específica aún representa un reto[107]. Por tal motivo, el uso de plantas con alto contenido de componentes bioactivos como *H. sabdariffa*, representa una

alternativa prometedora para potenciar tratamientos actuales y reducir efectos adversos.

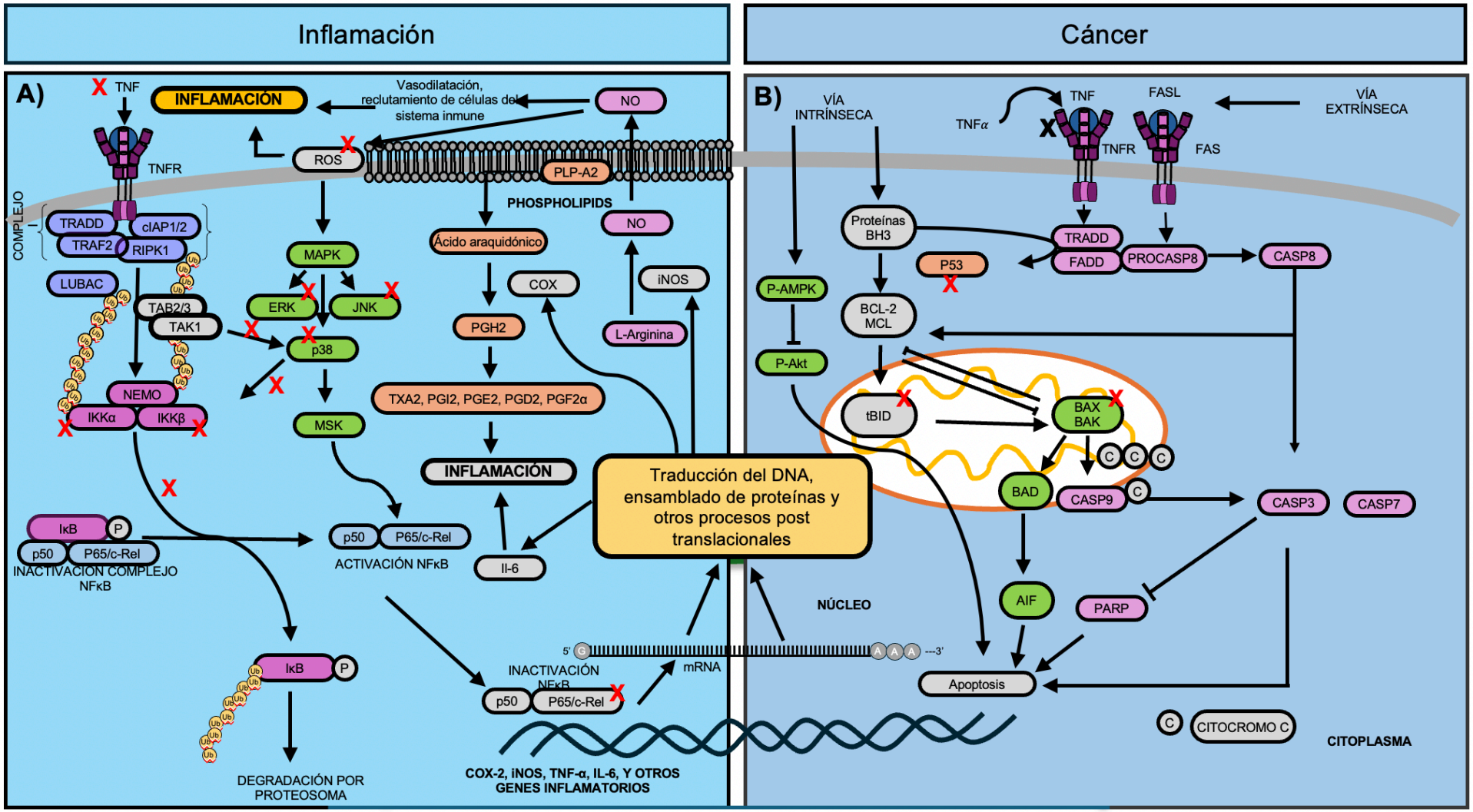


Figura 3. Mecanismos básicos de A) Inflamación, B) Desarrollo de cáncer y posibles dianas moleculares de los compuestos bioactivos de extractos de H. sabdariffa

2. Planteamiento del problema y justificación

El cáncer gástrico es la cuarta causa más común de muertes relacionadas con cáncer en el mundo [9]. La infección con *Helicobacter pylori (H.pylori)* está asociada al desarrollo de cáncer gástrico en aproximadamente el 60% de los casos[4]. Por otro lado, los extractos de cálices de jamaica (*H. sabdariffa)* han demostrado beneficios a la salud, principalmente en el tratamiento de la hipertensión, hipercolesterolemia e hiperlipidemia[40]. Asimismo, diversos estudios han reportado que *H. sabdariffa* posee efectos citotóxicos, antiproliferativos, antimutagénicos y antimetastásicos[40] en líneas celulares de distintos tipos de cáncer, como neuroblastoma[108], cáncer de mama[45], y en leucemia[45], aunque no necesariamente asociados a *H. pylori*. Sin embargo, la mayoría de los artículos disponibles se enfocan en aspectos económicos y la producción de la planta sin explorar sus posibles aplicaciones en cáncer gástrico o en la infección por *H. pylori* [40]. Considerando que esta bacteria es un factor de riesgo importante en el desarrollo de cáncer gástrico, resulta relevante investigar si *H. sabdariffa* tiene algún efecto antimicrobiano frente a *H. pylori.* Por lo tanto, este proyecto tiene como objetivo evaluar su potencial para disminuir, o prevenir dicha infección, proponiendo el tratamiento con diferentes extractos de *H. sabdariffa* como alternativa terapéutica de origen natural con bajo o nulo grado de toxicidad para la gastritis crónica y el cáncer gástrico relacionados a una infección inicial con *H. pylori.*

3. Objetivo

3.1 Objetivo General

Determinar el efecto de diferentes extractos de cálices de jamaica en modelos *in vivo* e *in vitro* de gastritis crónica y cáncer causados por la infección de *H. pylori.*

3.2 Objetivos Específicos

- Obtener extractos acuoso, acetónico, etanólico, metanólico y ácido hibiscus puro a partir de los cálices de *Hibiscus sabdariffa*, para identificar las diferencias en su composición y seleccionar aquellos con mayor potencial bioactivo frente a *Helicobacter pylori*.
- Evaluar la actividad bactericida de los extractos obtenidos frente a *Helicobacter pylori*, para determinar su capacidad antimicrobiana y establecer su viabilidad como alternativa terapéutica natural.
- Analizar el efecto de los extractos, a concentraciones de 100 mg/mL, 10 mg/mL, 1 mg/mL y 0.1 mg/mL, sobre la actividad ureásica de *H. pylori* en condiciones de pH 2, 3, 4, 5 y 7.4, mediante la prueba de ureasa con rojo de fenol, para conocer su potencial inhibitorio sobre un mecanismo clave de virulencia bacteriana.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos frente a *H. pylori* a 100 µg/mL, 20 µg/mL, 4 µg/mL y 0.8 µg/mL, para establecer las dosis más efectivas y seguras en aplicaciones antimicrobianas.
- Evaluar el efecto citotóxico de los extractos sobre células epiteliales gástricas humanas (línea AGS) a las mismas concentraciones, para estimar su seguridad en células humanas y su posible utilidad como agente con efecto antitumoral o terapéutico selectivo.
- Establecer un modelo *in vivo* de infección gástrica por *H. pylori* en jerbos de Mongolia (*Meriones unguiculatus*), para validar la eficacia terapéutica de los extractos en un entorno biológicoholístico.

4. Materiales y métodos

4.1 Diagrama metodológico

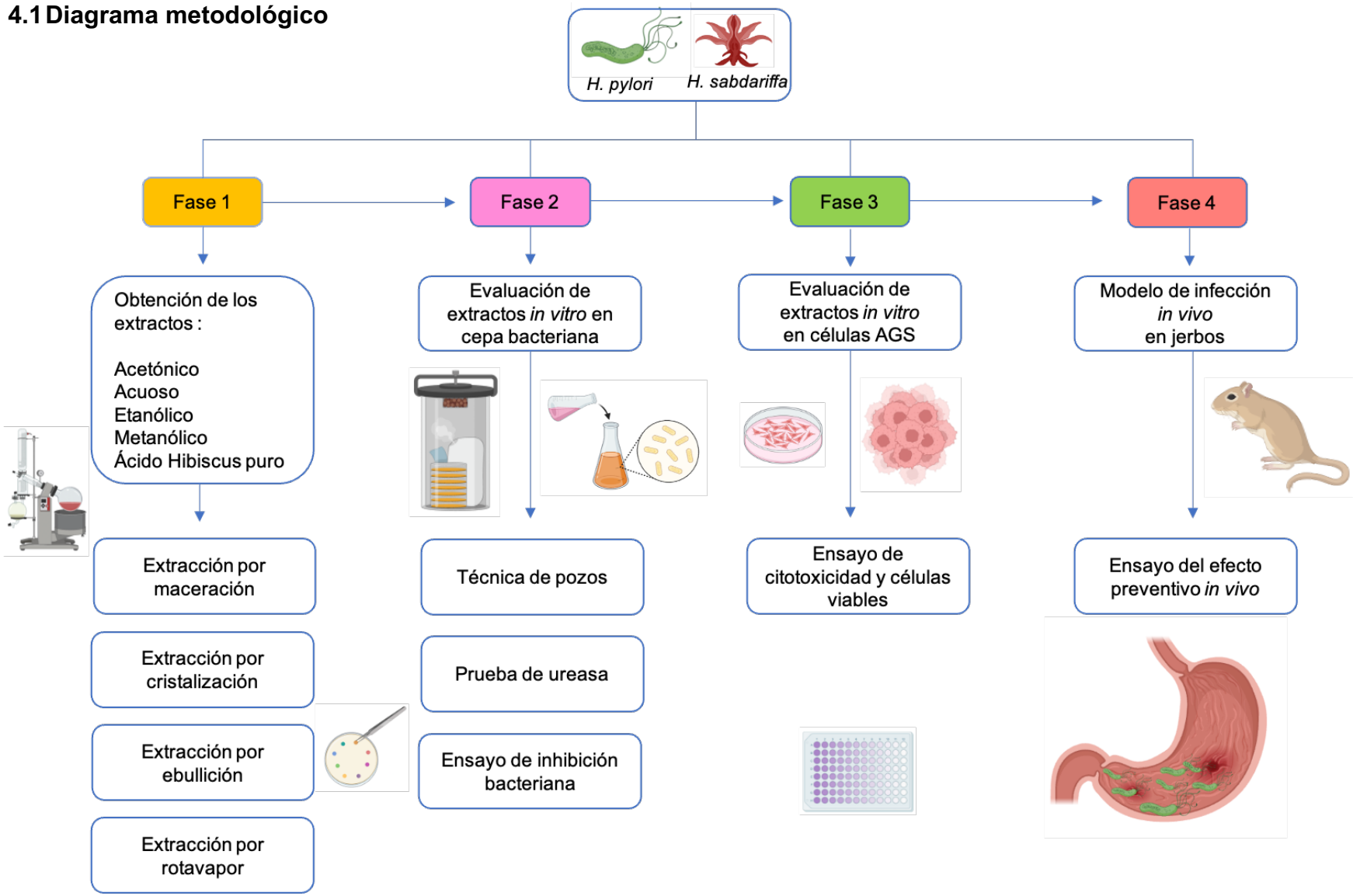


Figura 4. Diagrama metodológico general

4.2 Fase 1: Obtención de los extractos de *Hibiscus sabdariffa*

4.2.1 Extractos acuoso, acetónico, etanólico, metanólico y ácido hibiscus puro de *H. sabdariffa*

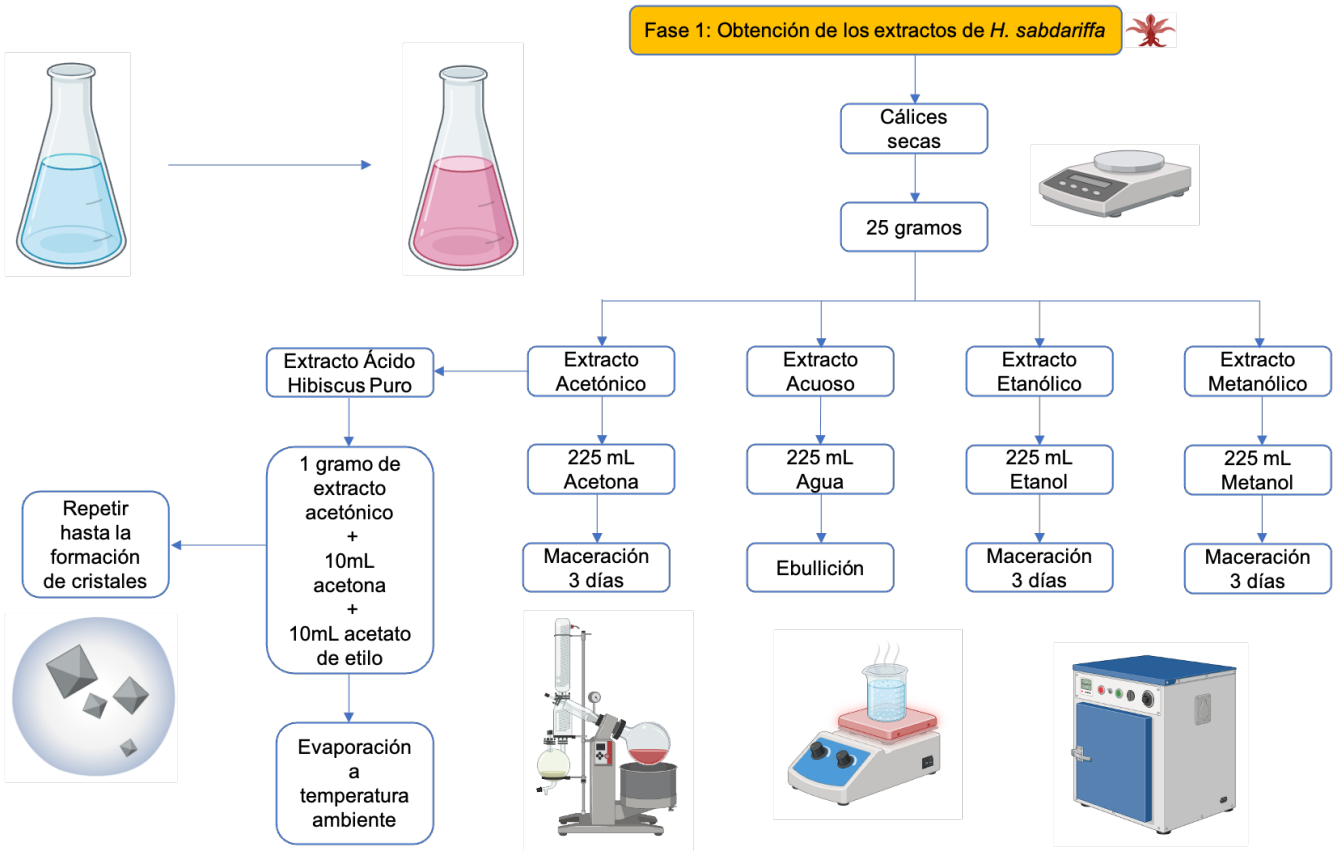


Figura 5. Diagrama metodológico Fase 1

4.2.1.1 Extracto acuoso. Para la obtención del extracto acuoso, se utilizaron 25 g de cálices secos, los cuales se colocaron en frascos estériles y se les añadieron 225 mL de agua. Los frascos fueron calentados hasta el punto de ebullición durante 10 minutos y posteriormente se dejaron enfriar a temperatura ambiente[63].

4.2.1.2 Extractos acetónico, etanólico y metanólico. Para los extractos acetónico, etanólico y metanólico, también se emplearon 25 g de cálices secos, los cuales se colocaron en frascos estériles y se les agregaron 225 mL de etanol al 96 %, 225 mL de metanol o 225 mL de acetona, según correspondiera. Los frascos se cerraron y se mantuvieron a temperatura ambiente durante tres días, con agitación manual una vez al día. Al término del periodo de maceración, la fase líquida se filtró mediante papel Whatman No. 4, y los extractos obtenidos se concentraron en un rotavapor. Para eliminar los restos de etanol y metanol, los extractos concentrados se colocaron en una incubadora de aire circulante a 45 ± 1 °C durante 24 horas[63].

4.2.1.3 Extracto de ácido hibiscus. El extracto puro de ácido hibiscus se obtuvo mediante cristalización. Se tomó 1 g del extracto acetónico y se disolvió en 10 mL de acetona. Luego se agregaron 10 mL de acetato de etilo y se dejó reposar durante una semana a temperatura ambiente, con una tapa de aluminio floja para favorecer la formación de cristales. Una vez formados, el sobrenadante se transfirió a otro frasco para facilitar la limpieza de los cristales. Este procedimiento se repitió, agregando acetona y acetato de etilo en proporción 1:1, hasta obtener cristales transparentes. Finalmente, se realizó resonancia magnética nuclear (RMN) para evaluar la pureza del compuesto.

Para realizar la espectroscopía de RMN de cristales de ácido hibiscus puro en agua deuterada (D_2O), se pesan entre 5–15 mg del cristal y se disuelven en un tubo de RMN con 600–700 µL de D_2O, asegurando disolución completa mediante agitación suave o calentamiento moderado (40–50 °C). El tubo, limpio y seco, se sella y ajusta para obtener un mínimo de 4 cm de altura de solución. Se registran espectros de ^{1}H (a 400–500 MHz) y, si se desea, de ^{13}C (aprox. 100 MHz) tras un shimming adecuado y calibración usando la señal residual de HDO (~4.79 ppm). Se

recomiendan 8–32 scans para ^{1}H, y hasta 1 000–10 000 para ^{13}C, con tiempos de relajación de 1–2 s (^{1}H) o 2–5 s (^{13}C), a temperatura ambiente (~298 K). En la fase de procesamiento, se aplican correcciones de fase y línea base, y se hace la asignación de señales, tomando en cuenta que los protones –OH y –COOH pueden intercambiarse con deuterio y quedar ausentes, por lo que para analizarlos podría usarse un solvente no protónico como CD_3OD. El ácido hibiscus puro se ha caracterizado y confirmado mediante RMN, infrarrojo y difracción de rayos X, como reporta Portillo-Torres y colaboradores (2019) durante el análisis de compuestos antimicrobianos de *Hibiscus sabdariffa*[64].

Todos los extractos se prepararon a una concentración inicial de 100 mg/mL. Para ello, se pesó 1 g de cada extracto y se disolvió en 9 mL de agua destilada.

.

4.3 Fase 2: Evaluación de extractos *in silico* e *in vitro* en cepa bacteriana

Se utilizó una cepa estándar de Helicobacter pylori (ATCC 700392), cultivada en placas Petri con medio infusión cerebro-corazón (BD Bioxon), suplementado con 5 % de suero fetal bovino y 1.5 % de agar. Las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37 °C en condiciones microaerofílicas (10 % de CO_2), utilizando una jarra de anaerobiosis en conjunto con el sistema BD GasPak™ EZ Campy Container System.

Asimismo, se empleó la cepa ATCC 43504. Para su activación, se incubó en condiciones microaerofílicas a 37 °C durante 48 a 72 horas. Posteriormente, se ajustaron 150 mL de medio caldo Mueller Hinton, suplementado con 0.2 % de β-ciclodextrina, a una densidad óptica de 0.05 a 0.1 a 600 nm, la cual fue determinada mediante la lectura de 30 µL del cultivo en un espectrofotómetro NanoDrop™ One/One C Microvolume UV-Vis (Figura 6).

4.3.2 Inhibición bacteriana de *H. sabdariffa*

La actividad antimicrobiana se evaluó por la técnica de difusión en pozos. Se sembraron 100 µL de *H. pylori* a concentraciones de 1×10^7 y 1×10^6 UFC/mL en placas Petri estériles de 90 × 15 mm. Luego, se realizaron cinco orificios en el agar utilizando el extremo de una pipeta Pasteur esterilizada. En cada pozo se depositaron 60 µL del extracto correspondiente. Las placas se mantuvieron en una campana de bioseguridad hasta que el extracto fue absorbido por el medio, y posteriormente se incubaron durante 24 horas en condiciones microaerofílicas, como se describió anteriormente. Finalmente, se midieron los diámetros de inhibición.

4.3.3.1. Ensayo de actividad ureásica

La actividad de la enzima ureasa se determinó mediante una modificación del método del rojo de fenol, basado en la producción de amonio por hidrólisis de urea (64,27,65). Se inocularon 100 µL de H. pylori en fase exponencial en tubos con 10 mL de medio BHI (infusión cerebro-corazón, BD Bioxon), suplementado con 5 % de suero fetal bovino. Los medios fueron ajustados a diferentes valores de pH (2, 3, 4, 5 y 7.4), y se incubaron por 24 h en una jarra de anaerobiosis con el sistema BD GasPak™ EZ Campy.

Posteriormente, se añadieron 3 mL de los extractos acuoso, metanólico, etanólico, acetónico y de ácido hibiscus (a 100 mg/mL), en diluciones 1:100, 1:1000 y 1:10,000, previamente esterilizados. Las mezclas se reincubaron bajo las mismas condiciones por 24 h.

La prueba de ureasa se realizó mediante la adición de 20 % p/v de urea, 0.012 % de rojo de fenol y PBS pH 6.5. A cada tubo Eppendorf se le agregaron 1.4 mL de solución de rojo fenol y 46.6 µL del cultivo tratado con extractos. Las muestras se incubaron por 1 hora a 37 °C y se midió la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro NanoDrop™, usando agua como blanco.

4.3.3 Actividad bactericida de los extractos de *H. sabdariffa* en cultivos de *H. pylori*

Se utilizó la cepa ATCC 43504 cultivada en caldo Mueller Hinton suplementado con β-ciclodextrina. Una vez activada, se colocaron 3 mL de cultivo en tubos con tapa, incubándose en jarra de anaerobiosis a 37 °C y 150 rpm. La curva de crecimiento se generó midiendo la densidad óptica (OD) a 660 nm en los tiempos 0, 24, 72 y 96 horas, para identificar las fases de crecimiento y estimar las UFC necesarias para los ensayos de antivirulencia y actividad bactericida.

Actividades en campana de flujo laminar:

Día 1: Se colocaron 100 µL de inóculo en medio agar sangre (aprox. media placa por 1 mL de medio).

Día 3: Se ajustó el inóculo a OD660 = 0.08. Se transfirieron 100 µL del cultivo a matraces de 250 mL estériles con 150 mL de caldo Mueller Hinton + β-ciclodextrina. De esta mezcla, se colocaron 3 mL en frascos de vidrio con tapa y se incubaron a 37 °C, 150 rpm, en anaerobiosis.

Día 4: Se añadieron los extractos a concentraciones finales de 100, 20, 4 y 0.8 µg/mL, correspondientes a diluciones desde 15 hasta 0.12 mg/mL. Los controles negativos fueron: Mueller Hinton + inóculo + DMSO y Mueller Hinton + inóculo sin extracto.

Día 5: Se midió la OD a 660 nm para cada muestra. Como blanco se utilizó solo el caldo Mueller Hinton, y como controles, las mezclas con los diferentes extractos en igual volumen.

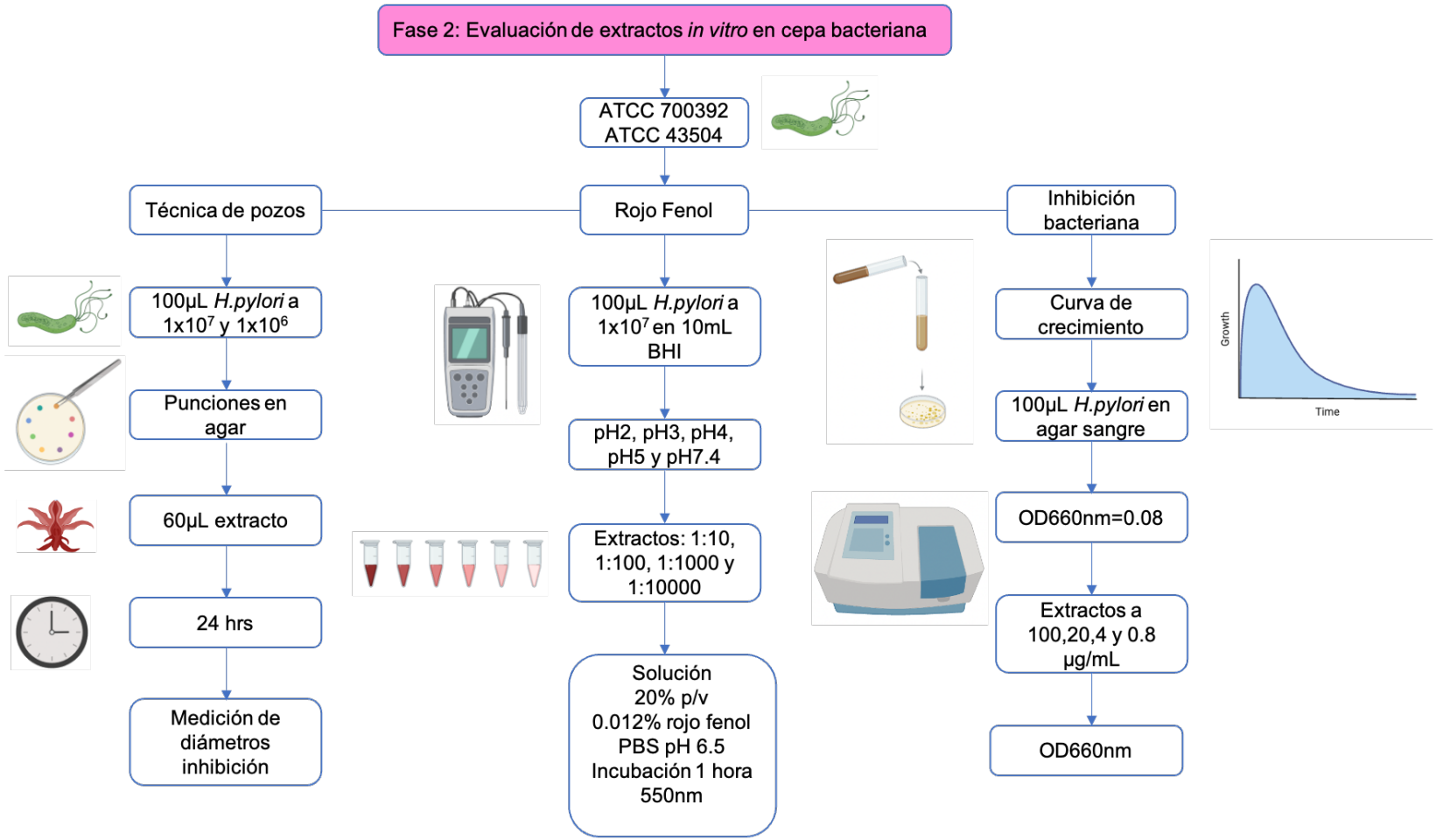


Figura 6. Diagrama metodológico Fase 2

4.4 Fase 3: Evaluación de extractos *in vitro* en células AGS

4.4.1 Mantenimiento de células AGS

Con base en la capacitación obtenida durante la estancia en el Laboratorio de Inmunología del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina (FACMED) de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la supervisión de la Dra. Erika Rendón Huerta, se adquirieron los conocimientos técnicos necesarios para el mantenimiento de la línea celular AGS.

El suero fetal bovino recién adquirido fue sometido a un proceso de inactivación del sistema de complemento. Para ello, se calentó a 56 °C en baño María durante 30 minutos. Posteriormente, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se almacenó en congelación hasta su utilización. Este paso es fundamental para evitar la interferencia del complemento en los ensayos, especialmente en pruebas inmunológicas.

El cultivo de las células AGS requirió el uso del medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), en presentación en polvo, cuyas especificaciones se describen a continuación:

- Low glucosa
- [+] L-glutamine
- [+] pyridoxine hyddrochloride
- [+] 110 mg/mL sodium piruvate
- [-] sodium bicarbonate
- REF 31600-034 10x1L
- LOT 2347442
- 2024-02-28

Para la preparación del medio DMEM en presentación en polvo, se vació un sobre en 800 mL de agua desionizada. Se agregaron 2 g de bicarbonato de sodio grado reactivo y se ajustó el pH a 7.4 mediante agitación magnética y medición con potenciómetro. Una vez ajustado el pH, se aforó la solución a 1 L y se verificó nuevamente el pH. El medio se filtró por membrana utilizando un sistema de filtración para botellas dentro de una campana de flujo laminar esterilizada con luz UV durante 20 minutos. El medio estéril fue envasado en botellas de 500 mL también estériles.

A cada 500 mL de DMEM se le añadieron, en condiciones de esterilidad, los siguientes suplementos: 1 mL de piruvato de sodio, 5 mL de L-glutamina, 5 mL de penicilina/estreptomicina y 50 mL de suero fetal bovino (SFB) previamente inactivado, correspondiente al 10% del volumen total.

Para la descongelación de células AGS provenientes del ultracongelador (Revco), se centrifugó un vial de 1 mL a 1,500 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, se transfirió el pellet a un tubo cónico de 15 mL con 3 mL de medio fresco. Se resuspendió cuidadosamente el pellet, se centrifugó nuevamente, se descartó el sobrenadante y se volvió a resuspender en 1 mL de medio. Esta suspensión celular se transfirió a una caja Petri estéril con 5 mL de medio fresco y se incubó a 37 °C en atmósfera con 5% de CO_2.

Al día siguiente de la descongelación, se procedió al lavado celular para eliminar células no adheridas. Se retiró el medio, se agregaron 2 mL de PBS 1X, se distribuyó uniformemente y se descartó. Este procedimiento se repitió de dos a tres veces, según la observación microscópica inicial. Posteriormente, se añadieron 8 mL de medio fresco y las células se mantuvieron en incubación.

Cuando la confluencia alcanzó el 80–90%, se procedió al despegue celular, ya fuera para subcultivo o criopreservación. Se retiró el medio y se realizaron dos lavados con 3 a 4 mL de PBS 1X. Posteriormente, se añadió 1 mL de tripsina-EDTA y se incubó durante 5 minutos (máximo) a 37 °C. Las células fueron resuspendidas en

4 mL de medio, transferidas a un tubo cónico estéril de 15 mL y centrifugadas a 1,500 rpm por 5 minutos. Se retiró cuidadosamente el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 mL de medio fresco.

Para el conteo celular, se tomó una alícuota de 10 µL de la suspensión y se diluyó en 490 µL de DMEM, obteniendo una dilución 1:50. El conteo se realizó en una cámara de Neubauer y se calculó el número de células por mililitro aplicando la fórmula estándar: promedio de células por cuadrante × factor de dilución × 10^4 ÷ 4.

Dado que una caja Petri permite un cultivo de aproximadamente 4.8 × 10^6 a 5 × 10^6 células, se ajustó el inóculo de manera que se alcanzara un 90% de confluencia en el momento requerido para los experimentos o para su congelación.

Para la criopreservación, se utilizó la suspensión obtenida tras el despegue celular, considerando que por cada vial de congelación se almacenaron 1 × 10^6 células en 1 mL de mezcla de DMEM con glicerol al 10%. Por ejemplo, al disponer de 10 × 10^6 células, se prepararon 10 mL de mezcla conteniendo 1.25 mL de glicerol, 1 mL de suspensión celular y 7.75 mL de DMEM, asegurando que el glicerol fuera añadido al final y mezclado suavemente para homogenizar.

4.4.2 Ensayo de citotoxicidad

La prueba de citotoxicidad se llevó a cabo con base en un protocolo adaptado de Chua et al.[99]. Para ello, se sembraron 20,000 células por pozo en microplacas de cultivo de 96 pozos (Corning), bajo las condiciones de cultivo previamente descritas, hasta alcanzar aproximadamente un 90% de confluencia. Posteriormente, se evaluaron cuatro concentraciones distintas de los extractos de *Hibiscus sabdariffa* (100 µg/mL, 20 µg/mL, 4 µg/mL y 0.8 µg/mL), previamente diluidas en DMSO. Las soluciones fueron adicionadas a las células por triplicado con el fin de evaluar su efecto citotóxico. Tras un periodo de incubación de 3 horas, la viabilidad celular se determinó mediante la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm utilizando un espectrofotómetro, y el porcentaje de viabilidad se calculó con base en los valores obtenidos.

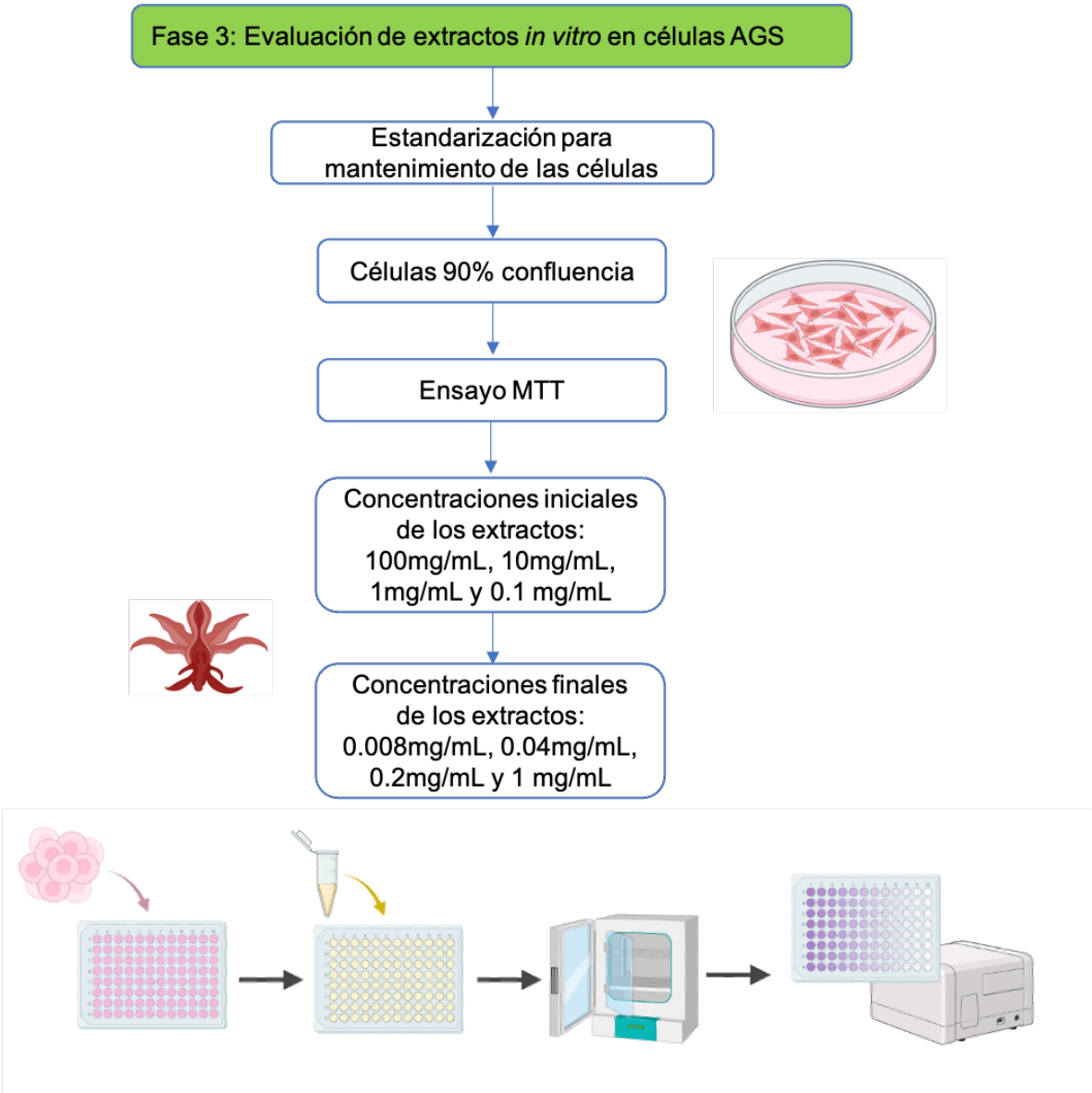


Figura 7. Diagrama metodológico Fase 3

4.5 Fase 4: Modelo de infección *in vivo* en jerbos (*Meriones ungiculatus)*

El proyecto titulado: “Evaluación del efecto antimicrobiano *in vivo* del extracto acetónico y ácido hibiscus obtenidos a partir de *Hibiscus sabdariffa* contra *Helicobacter pylori”,* fue dictaminado y aprobado por el comité institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la UAEH (CICUAL) (Anexo Figura 28).

Para llevar a cabo la infección gástrica con *H. pylori* en jerbos, se emplearon animales macho, dado que se ha reportado su mayor susceptibilidad a esta bacteria[100]. Inicialmente se utilizaron nueve jerbos. Los animales fueron colocados en jaulas metabólicas para evitar la coprofagia y sometidos a un ayuno de 12 horas. Posteriormente, se les administraron 0.5 mL de una solución de $NaHCO_3$ 0.2 M por vía intragástrica utilizando una cánula metálica. Treinta minutos después, se les inoculó con 0.5 mL de una suspensión bacteriana de *H. pylori* (cepa ATCC 43504) a una concentración de 1×10^9 UFC. Este procedimiento se repitió cuatro veces, con un intervalo de 48 horas entre cada inoculación, durante una semana. El proceso completo de infección se repitió dos veces más, con una semana de descanso entre cada ciclo[101,102].

La inoculación experimental inicial tuvo una duración total de 42 días. Al final del experimento (día 42), los animales fueron sometidos nuevamente a un ayuno de 12 horas en jaulas metabólicas y posteriormente sacrificados por dislocación cervical. Se procedió con la disección del estómago y, bajo condiciones estériles en campana de flujo, se retiró el *forestomach* (estómago anterior), estructura que funciona como reservorio de alimentos en jerbos y no forma parte del estómago glandular propiamente dicho[103]. Se realizó un corte sobre la curvatura menor para exponer la mucosa gástrica, la cual se mantuvo hidratada con PBS 1X y fue enjuagada con la misma solución. La mucosa fue raspada cuidadosamente utilizando primero una espátula estéril y posteriormente una punta de micropipeta estéril de 1 mL. Una porción del raspado se transfirió a una placa de 96 pozos para la realización de la prueba rápida de ureasa.

Posteriormente, los estómagos completos de los nueve jerbos fueron colocados en tubos con 15 mL de medio Mueller Hinton-B líquido suplementado con 10% de suero

fetal bovino (SFB), y se homogenizaron mediante agitación vigorosa con micropipeta. Se realizaron diluciones seriadas del homogenizado (0, -1, -2 y -3), y se sembraron 0.1 mL de cada dilución en placas de agar sangre. Las placas fueron incubadas en condiciones microaerofílicas utilizando un sistema BD GasPak™ EZ Campy Container, con monitoreo cada 24 horas durante 96 horas a 37 °C. La confirmación de la infección se realizó mediante pruebas bioquímicas estándar: oxidasa, catalasa y tinción de Gram.

La actividad ureásica se cuantificó mediante una prueba rápida en discos de papel, según el método descrito por Castillo-Juárez et al, (2009)[104]. Se preparó una solución compuesta por 0.02% de azul de bromotimol (Merck), 0.05% de rojo fenol (Sigma) y 6% de urea (Gibco BRL), disuelta en agua destilada y ajustada a pH 4.5 con HCl. Esta solución se aplicó sobre discos de papel filtro (Whatman No. 1), previamente recortados al tamaño de las cajas Petri, utilizando un atomizador de cromatografía. Los discos fueron secados durante dos minutos antes de ser utilizados. Para la evaluación, los discos impregnados se colocaron brevemente sobre la superficie de las colonias en cultivo y se retiraron de inmediato. La presencia de ureasa activa se evidenció por un halo de color rosado alrededor de las colonias.

El procedimiento de infección y aislamiento descrito fue replicado en una segunda ocasión utilizando 14 jerbos y una tercera vez con 9 jerbos adicionales.

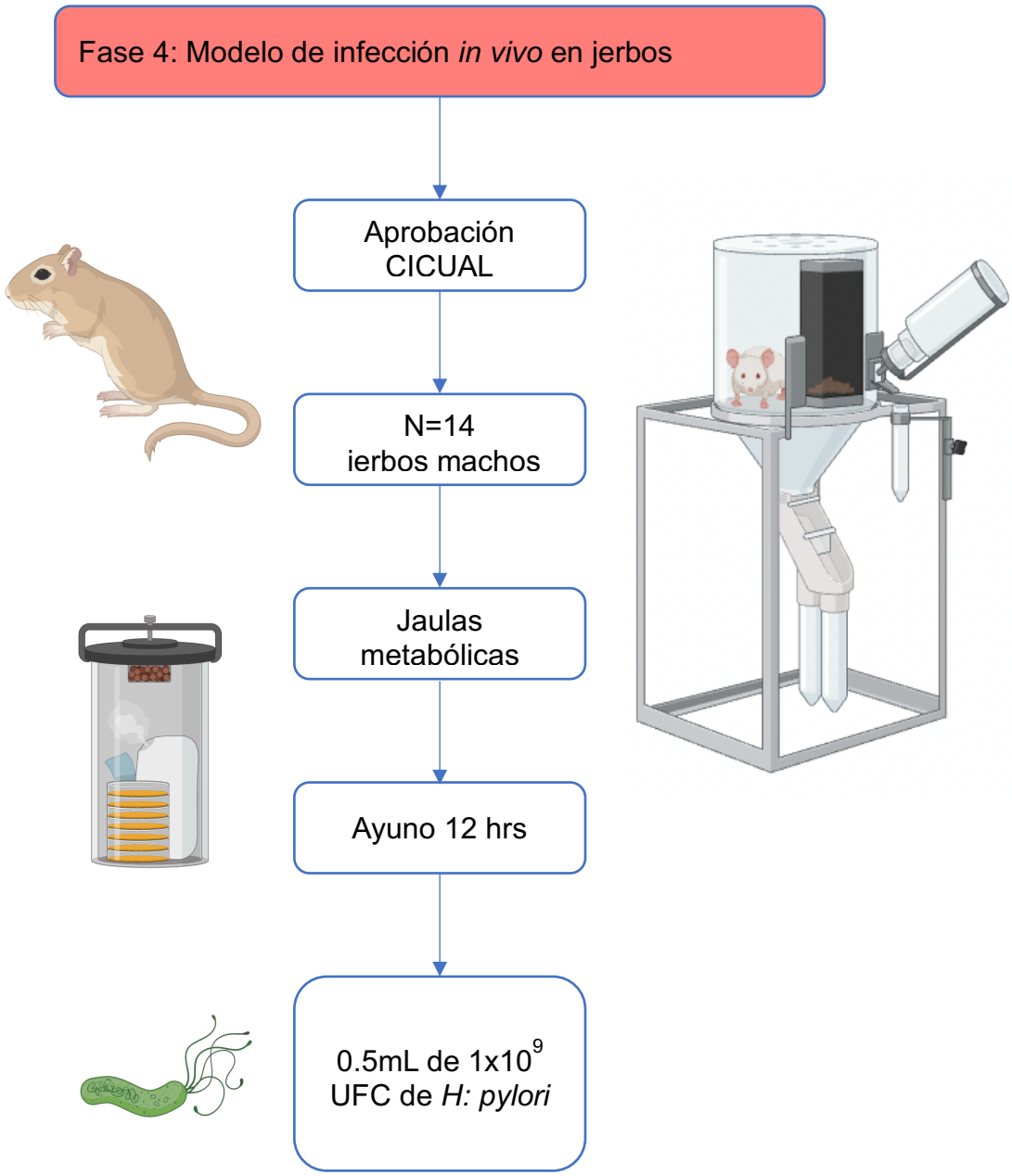
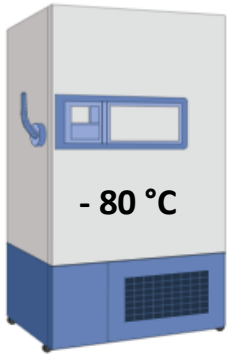
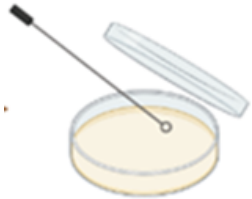


Figura 8. Diagrama metodológico Fase 4





Activación de la cepa

24 a 72 h de crecimiento microaerofília

50 mL MH-0.2 % ciclodextrina

Incubación a 37°C, 150rpm, 24 hrs

Ajustar 100 mL a D.O. $_{600\ nm}$ = 0.05 con MH-0.2 % b ciclodextrina

Transferir 3 mL en tubos de ensayo . Incubar en jarra grande de ambiente microaerofílico a 37 °C, 150 rpm.

Figura 9. Diagrama metodológico Fase 4

4.6 Análisis estadístico

Para el análisis comparativo de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos en los diferentes grupos experimentales, se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, porque no se cumplieronn los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas requeridos en los métodos paramétricos. Así, se establecieron diferencias significativas globales entre los grupos evaluados.

En cuanto al análisis de los porcentajes de inhibición, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks para identificar diferencias generales entre los grupos. Posteriormente, se realizó un análisis post hoc mediante la prueba de Student-Newman-Keuls, con el propósito de determinar específicamente entre qué grupos se encontraban dichas diferencias. Este procedimiento complementario posibilitó una interpretación más detallada y precisa de los resultados.

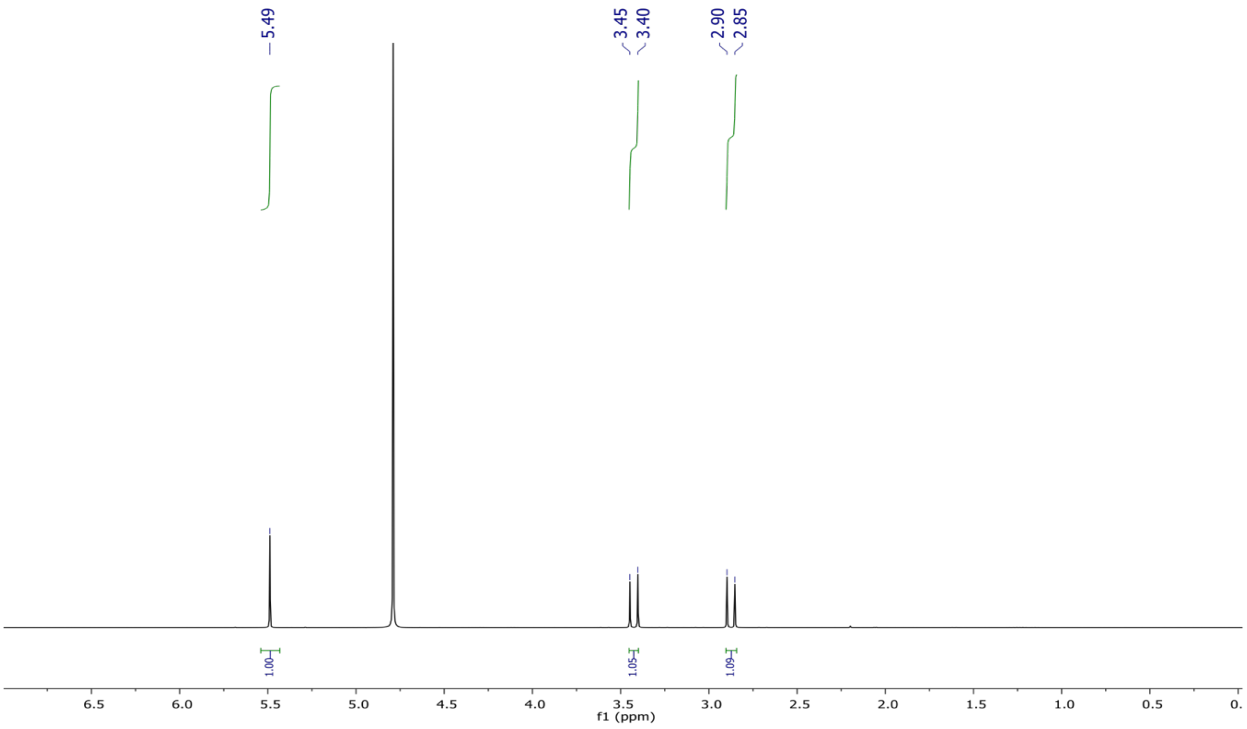
En el gráfico de los resultados de viabilidad celular, se aplicó la prueba e Student-Newman-Keuls como análisis post hoc, lo que permitió identificar de manera específica las comparaciones entre grupos con diferencias estadísticamente significativas. Este abordaje estadístico proporcionó una evaluación rigurosa y confiable de la respuesta celular frente a los tratamientos analizados.

5. Resultados y discusión

5.1 Extractos acuoso, acetónico, etanólico, metanólico y ácido hibiscus puro a partir de las cálices de *H. sabdariffa.*

En este proyecto, se determinó la pureza de los cristales obtenidos de ácido hibiscus (Figura 11) mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (^{1}H - RMN) (Figura 12), utilizando agua deuterada (D_2O). En el espectro obtenido, se observa una señal a 5.49 ppm, la cual corresponde a un protón situado en la posición δ respecto al grupo éster, específicamente en un carbono unido a un átomo de oxígeno. Este tipo de señal es una de las características principales de compuestos que contienen grupos éster.

Figura 10. Cristales obtenidos de ácido hibiscus puro por el método de cristalización



^{1}H NMR (400 MHz, Deuterium Oxide) δ 5.49 (s, 1H), 3.43 (d, *J* = 17.9 Hz, 1H), 2.87 (d, *J* = 17.8 Hz, 1H).

Figura 11. Espectro de RMN de protón de ácido hibiscus

Un estudio realizado por Ibnusaud *et al.* (2019) también aisló cristales de ácido hibiscus a partir de extractos acetónicos de cálices de *Hibiscus sabdariffa*. En su análisis por ^1H-RMN, identificaron señales a δH 5.34 (s, CH-COOH), 4.16 (s, COH-COOH) y 3.25/2.77 (d, J = 17.2 Hz, H_a/H_b-C-C=O), que corresponden a protones en el grupo carboxilo y en el enlace C-C=O, respectivamente. Estas señales son consistentes con las observadas en el presente estudio, lo que respalda la identificación estructural del ácido hibiscus[109].

Además, Simaratanamongkol *et al.* (2014) reportó la obtención de cristales de ácido *hibiscus* mediante fraccionamiento cromatográfico de extractos acetónicos. En su análisis por ^1H-RMN, detectaron señales a δH 5.17 (s), 3.21 (d, J = 17.86 Hz) y 2.77 (d, J = 17.86 Hz), que también corresponden a protones en el grupo carboxilo y en el enlace C-C=O. Estas observaciones son similares a las obtenidas en el presente estudio, lo que refuerza la validez de los resultados obtenidos. En conjunto, estos estudios proporcionan evidencia adicional sobre la estructura y pureza del ácido *hibiscus* aislado, confirmando la fiabilidad de los métodos utilizados en este proyecto[110].

5.4 Actividad antimicrobiana de *H. sabdariffa* vs. *H. pylori*

La medición de los halos de inhibición generados por cada extracto reveló los siguientes promedios (en milímetros): 15.02 para el extracto acuoso, 14.34 para el etanólico, 12.90 para el metanólico, 20.29 para el acetónico y 20.89 para el ácido hibiscus. Estos resultados indican que el extracto acetónico y el ácido hibiscus fueron los que presentaron mayor capacidad inhibitoria frente al crecimiento de *H. pylori* (Figuras 13 y 14).

La actividad antimicrobiana observada es congruente con estudios previos que han evaluado el efecto de extractos vegetales sobre *H. pylori*. Por ejemplo, en una investigación realizada con *Combretum molle*, el extracto acetónico mostró una notable actividad antimicrobiana, con zonas de inhibición de hasta 38 mm,

superando la eficacia de otros solventes y siendo comparable a antibióticos como el metronidazol [57,110,112].

Respecto al ácido *hibiscus*, estudios con *Hibiscus rosa-sinensis* han demostrado que sus extractos etanólicos y sus fracciones (como la de acetato de etilo) presentan una potente actividad antimicrobiana frente a cepas resistentes de *H. pylori*. Estas fracciones han reportado concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de 0.2–0.25 mg/mL y concentraciones mínimas bactericidas (MBC) de 1.25–1.5 mg/mL, además de mostrar capacidad para inhibir la formación de biofilm y la actividad ureásica de la bacteria[36] .

Las diferencias en la eficacia observada entre los distintos extractos pueden explicarse, en gran parte, por la polaridad de los solventes empleados. Los solventes orgánicos menos polares, como el acetato de etilo o el acetónico, permiten una mayor extracción de flavonoides, terpenoides y otros compuestos lipofílicos con actividad antimicrobiana comprobada. En contraste, extractos obtenidos con solventes más polares, como el metanol, tienden a mostrar una menor actividad, posiblemente debido a la extracción preferencial de metabolitos con menor efecto bactericida. Varios estudios han confirmado que la eficiencia antimicrobiana está estrechamente vinculada al perfil de metabolitos secundarios extraídos, lo que se refleja en distintas capacidades inhibitorias frente a *H. pylori*.

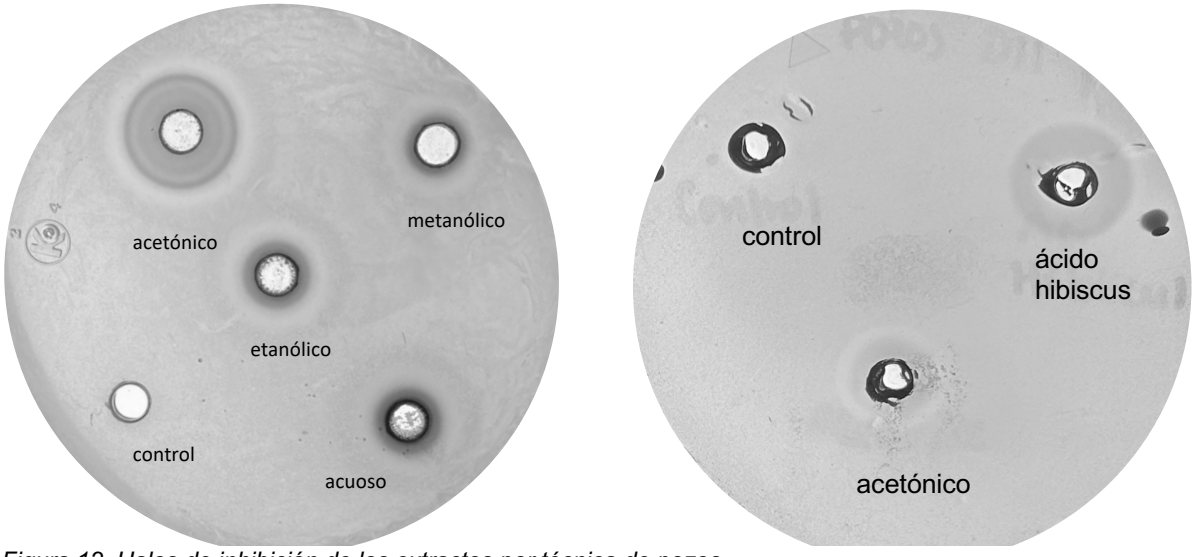


Figura 12. Halos de inhibición de los extractos por técnica de pozos

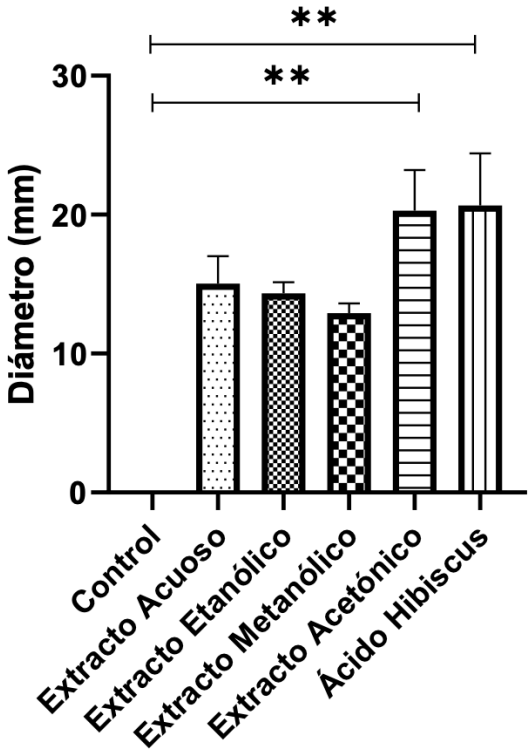


Figura 13. Gráfica comparativa de los diámetros de los halos de inhibición

Todos los extractos tienen efecto, pero son el extracto acetónico y el ácido hibiscus los que muestran diferencias significativas respecto al control negativo. Se realizó el análisis estadístico no paramétrico para comparar grupos respecto al control mediante la prueba de Kruskal-Wallis en el programa Graphpad Prism versión 8.0.

La actividad ureásica de *Helicobacter pylori* es fundamental para su supervivencia y colonización del epitelio gástrico[113]. La ureasa, una enzima clave de este patógeno, se considera uno de sus principales factores de virulencia. No obstante, a pH extremadamente bajo (1–2), su acción permite únicamente una supervivencia transitoria, limitada a unas pocas horas[114]. Diversas plantas han sido estudiadas por su potencial para inhibir esta enzima, entre ellas la palmatina y el jengibre, las cuales se perfilan como candidatas terapéuticas prometedoras en el tratamiento de la gastritis y las úlceras pépticas asociadas a infecciones por *H. pylori*[115,116]. Sin embargo, los estudios enfocados en *H. sabdariffa* y su posible efecto sobre la actividad ureásica de *H. pylori* aún son escasos y requieren mayor desarrollo.

Se presentan las gráficas correspondientes a los cultivos de *Helicobacter pylori* tratados con extractos acetónico, etanólico, metanólico, acuoso, así como con ácido hibiscus puro, evaluados a diluciones de 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10,000, bajo condiciones de pH 2, 3, 4, 5 y 7.4. Como control negativo, se incluyeron cultivos del patógeno expuestos a los mismos valores de pH pero sin tratamiento. Los resultados evidencian que todos los extractos ejercen un efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática de la ureasa, independientemente del pH. Sin embargo, se observó que la dilución 1:10 produjo una inhibición significativamente mayor en comparación con el control, lo que sugiere un efecto concentración-dependiente en la capacidad inhibitoria de los compuestos analizados (Figuras 15-19).

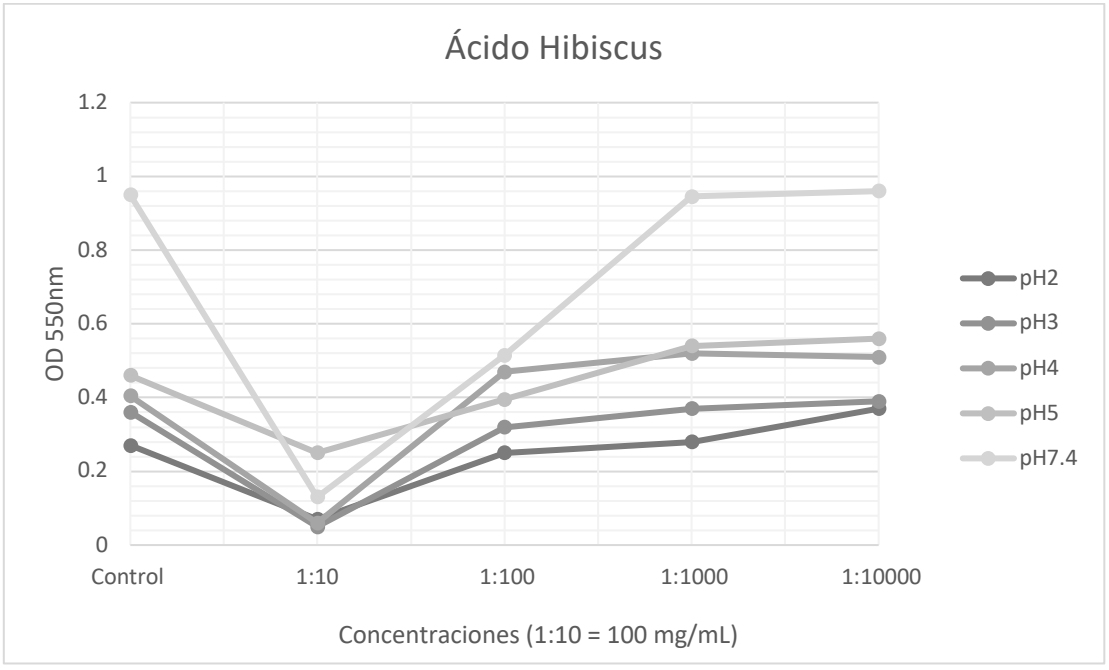


Figura 14. Gráfica de ácido hibiscus vs. H. pylori a diferentes concentraciones (1:10, 1:100, 1:1000, y 1:10,000) siendo 1:10 = 100mg/mL, y a pH2, pH3, pH4, pH5 y pH7.4, a una OD=550nm.

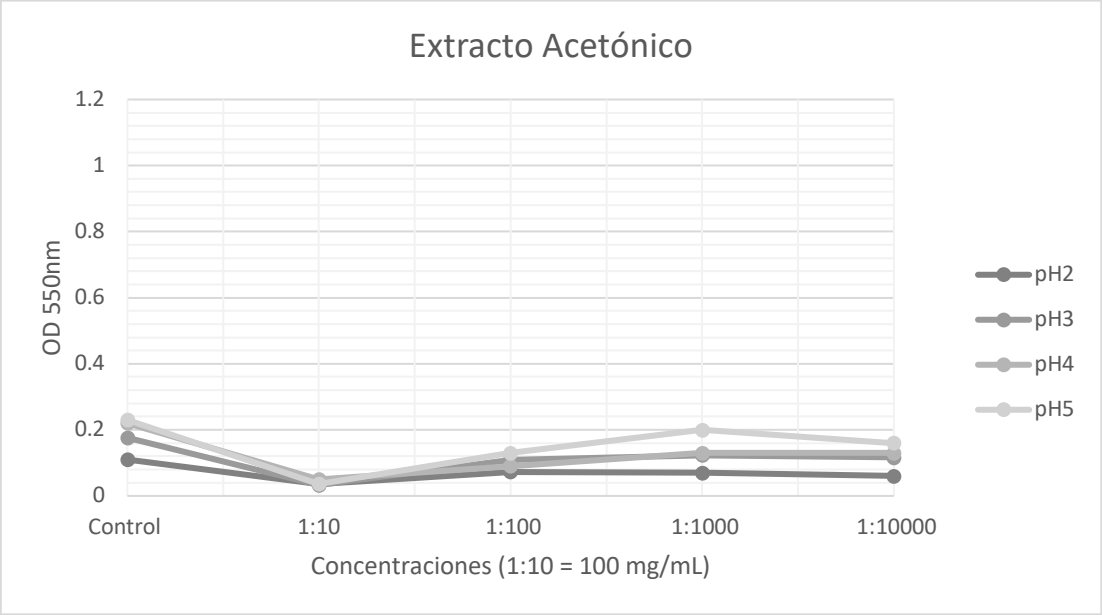


Figura 15. Gráfica de extracto acetónico vs. H. pylori a diferentes concentraciones (1:10, 1:100, 1:1000, y 1:10,000) siendo 1:10 = 100mg/mL, y a pH2, pH3, pH4, pH5 y pH7.4, a una OD=550nm.

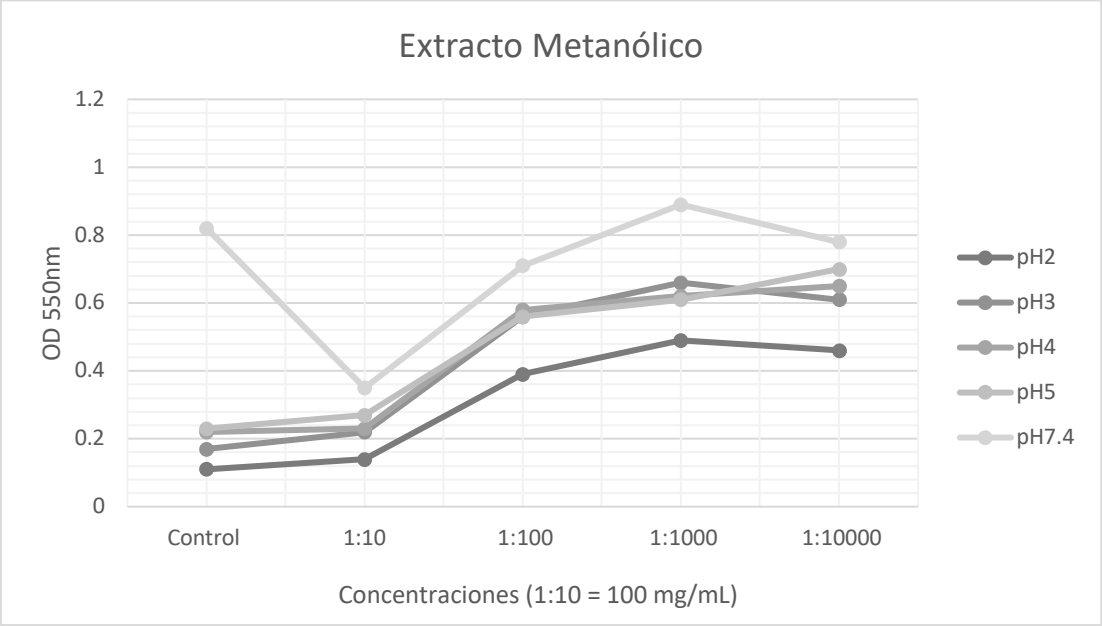


Figura 16. Gráfica de extracto metanólico vs. H. pylori a diferentes concentraciones (1:10, 1:100, 1:1000, y 1:10,000) siendo 1:10 = 100mg/mL, y a pH2, pH3, pH4, pH5 y pH7.4, a una OD=550nm.

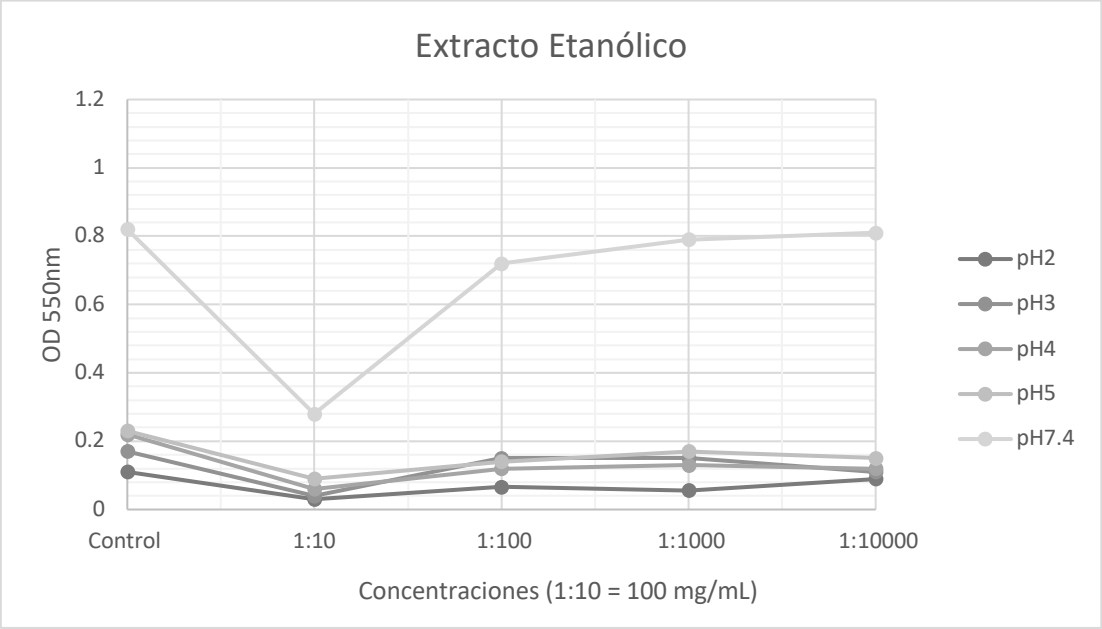


Figura 17. Gráfica de extracto etanólico vs. H. pylori a diferentes concentraciones (1:10, 1:100, 1:1000, y 1:10,000) siendo 1:10 = 100mg/mL, y a pH2, pH3, pH4, pH5 y pH7.4, a una OD=550nm.

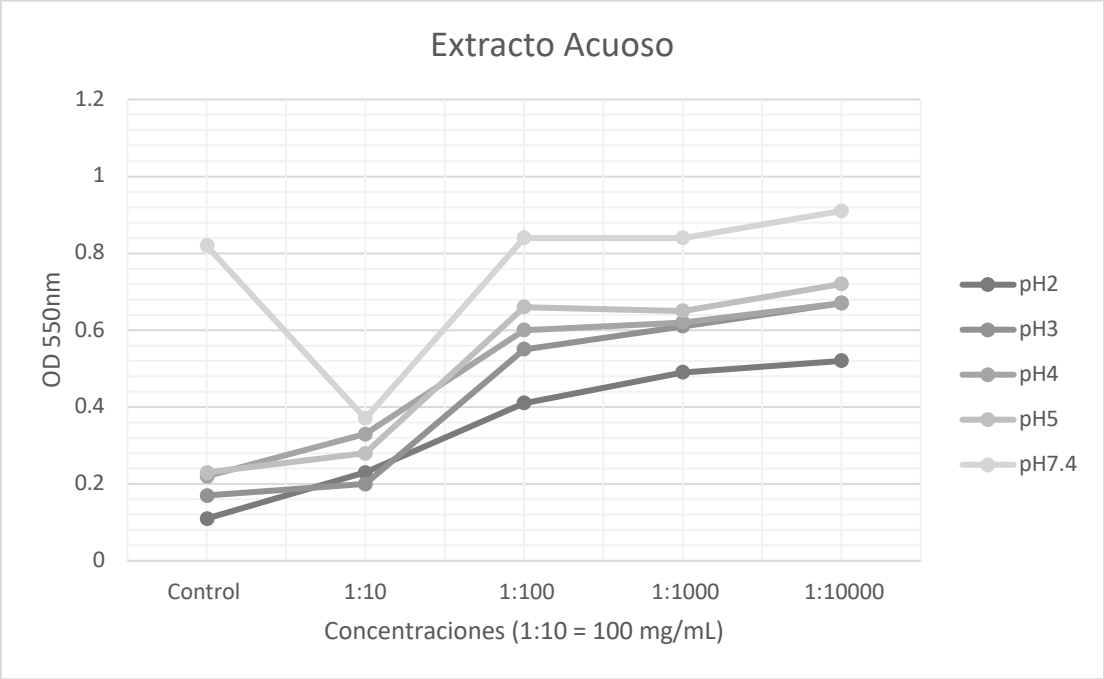


Figura 18. Gráfica de extracto acuoso vs. H. pylori a diferentes concentraciones (1:10, 1:100, 1:1000, y 1:10,000) siendo 1:10 = 100mg/mL, y a pH2, pH3, pH4, pH5 y pH7.4, a una OD=550nm.

Evaluación de la inhibición de la actividad ureasa por extractos de *H. sabdariffa* y ácido hibiscus

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que todos los extractos de *H. sabdariffa* (acetónico, etanólico, metanólico, acuoso) y el ácido hibiscus puro presentaron una inhibición significativa de la actividad de la ureasa de *Helicobacter pylori*. Este efecto fue más pronunciado a una concentración de 1:10, en comparación con otras diluciones, bajo diferentes condiciones de pH (2, 3, 4, 5 y 7.4), y fue estadísticamente superior al control negativo (cultivos sin tratamiento). Esta respuesta sugiere una relación concentració-dependiente en la eficacia de los compuestos, lo cual es coherente con la inhibición observada previamente en las pruebas de halos de crecimiento, donde también destacaron el extracto acetónico y el ácido hibiscus como los más potentes. Estos hallazgos son consistentes con estudios previos. Por ejemplo, se ha documentado que extractos de *Acacia nilotica* y *Calotropis procera* también inhiben la ureasa de *H. pylori* en ensayos tipo rojo fenol, con mecanismos de inhibición competitiva o mixta[117,118]. De igual manera, investigaciones con *Coptis chinensis* demostraron que la inhibición de la ureasa es concentración-dependiente[115], reforzando la hipótesis de que la efectividad antimicrobiana de los extractos vegetales está influida por su concentración.

El pH es un parámetro crítico para el crecimiento y la actividad metabólica de *H. pylori*, dada su necesidad de sobrevivir en el entorno ácido del estómago humano. La enzima ureasa permite a la bacteria neutralizar el pH gástrico local mediante la generación de amoníaco. No obstante, diversos estudios han señalado que esta estrategia de defensa solo es efectiva por un periodo limitado en condiciones extremadamente ácidas (pH 1–2)[114].

Asimismo, se destaca que la concentración de 100 mg/mL del ácido hibiscus puro resultó ser la más efectiva, sin evidencia de toxicidad visible en el cultivo, lo que refuerza su potencial como agente terapéutico. Esta concentración se alinea con valores reportados como viables para desarrollo preclínico, y fortalece su candidatura para aplicaciones farmacéuticas dirigidas a infecciones gástricas resistentes.

Para estandarizar las condiciones experimentales y evaluar el efecto de los tratamientos en la fase activa del crecimiento bacteriano, se realizó una curva de crecimiento de *H. pylori*, enfocándose en su fase logarítmica o exponencial (Figura 20). Además, considerando la necesidad de reducir la variabilidad de los medios de

cultivo derivados del suero fetal bovino, se optó por utilizar β-ciclodextrina como suplemento. Esta alternativa ha sido previamente validada para el cultivo de *H. pylori*, permitiendo condiciones químicamente definidas y evitando posibles interferencias asociadas a componentes séricos complejos[119]. Esto permitió una mayor precisión en la medición del impacto de los extractos y del ácido hibiscus en la fisiología bacteriana, particularmente en la modulación de la ureasa.

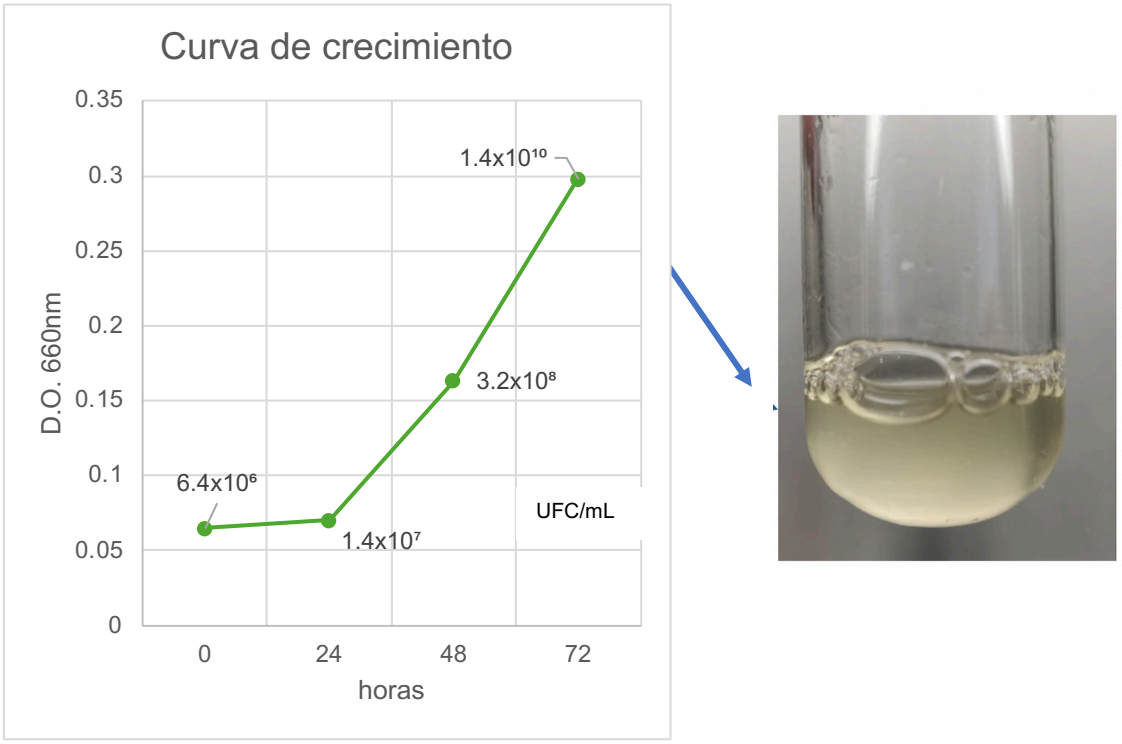


Figura 19. Curva de crecimiento de H. pylori ATCC 43504 en un lapso de 0 a 75 hrs expresada en UFC/mL a una D.O. 660nm

También, es sabido que el suero fetal bovino favorece una mayor producción de la citotoxina VacA; sin embargo, su uso puede introducir macromoléculas interferentes que dificultan el estudio de proteínas extracelulares. En contraste, la β-ciclodextrina permite la secreción de proteínas sin la presencia de estas interferencias, lo que la hace más adecuada para estudios específicos de proteínas secretadas. Y, finalmente, la β-ciclodextrina también es efectiva para mantener la morfología espiral de *H. pylori*, prolongando su viabilidad en cultivo, lo cual es relevante porque la forma cocoide de este patógeno ha sido asociada a una disminución de su viabilidad [120,121].

En cuanto a los ensayos comparativos de inhibición bacteriana, los extractos etanólico, metanólico y acetónico a una concentración de 1 mg/mL mostraron porcentajes de inhibición considerables frente a *H. pylori*, incluso comparables o superiores a los antibióticos metronidazol (0.2 mg/mL) y amoxicilina (0.0001 mg/mL). De entre ellos, el extracto metanólico destacó como el más efectivo a dicha concentración. Si bien la amoxicilina demostró su potencia a una dosis significativamente menor, el hallazgo de una respuesta positiva al ácido hibiscus a 1 mg/mL refuerza su potencial como agente antibacteriano complementario, especialmente frente a cepas resistentes (Figura 21).

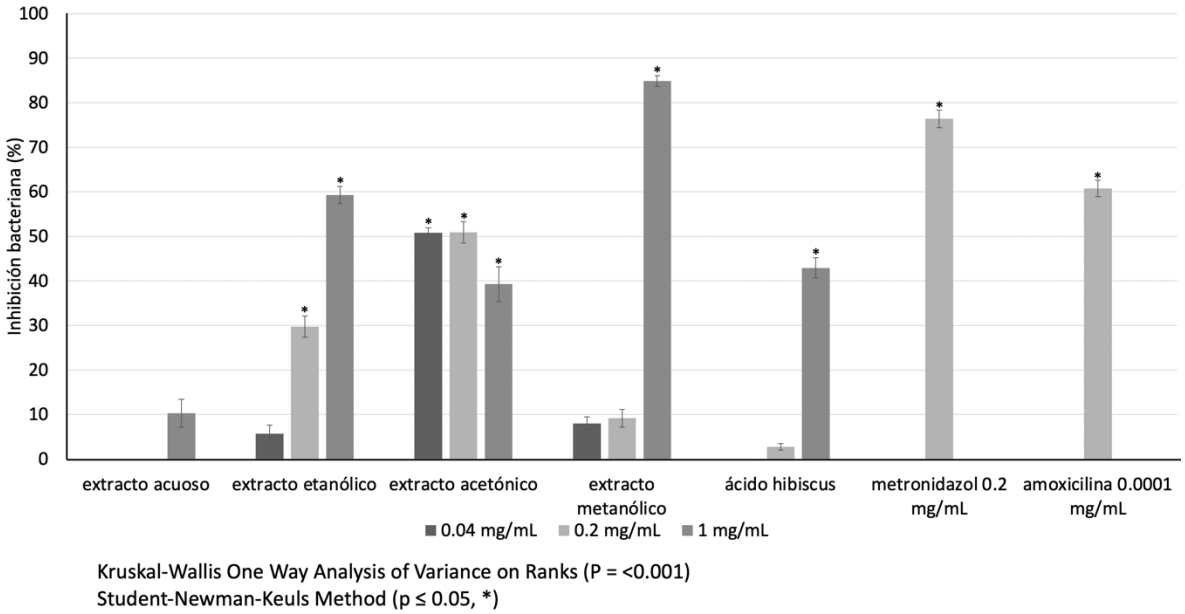


Figura 20. Gráfica de la inhibición bacteriana vs. H. pylori expresada en porcentaje de los diferentes extractos a concentraciones de 0.04, 0.2 y 1 mg/mL.

El extracto metanólico mostró una inhibición bacteriana significativa (~85%) a una concentración de 1 mg/mL. Este hallazgo concuerda con estudios previos que han demostrado la superioridad del extracto metanólico frente a otros solventes. Por ejemplo, se reportó que el extracto metanólico de *H. sabdariffa* inhibió el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, alcanzando zonas de inhibición de 24 mm y 22 mm, respectivamente, a concentraciones de 200 mg/mL. La presencia de flavonoides y alcaloides en este tipo de extracto podría explicar dicha actividad, ya que estos compuestos son conocidos por su capacidad para interferir con la integridad de la membrana celular bacteriana[122,123].

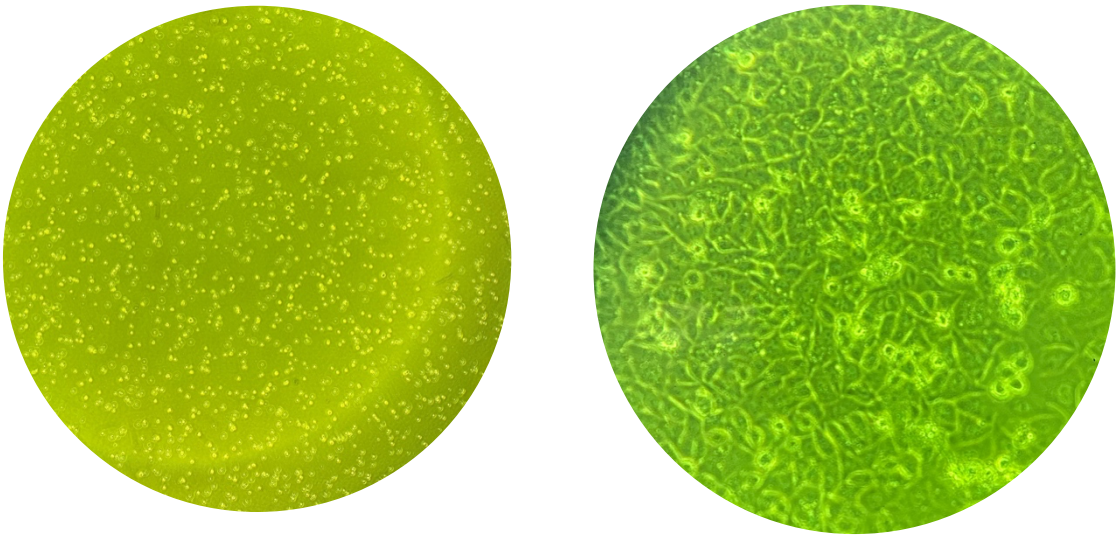
El extracto acetónico, por su parte, presentó una inhibición bacteriana notable (~50%) incluso a bajas concentraciones (0.04 mg/mL), lo que sugiere la presencia de compuestos bioactivos altamente potentes. Aunque la literatura específica sobre extractos acetónicos de *H. sabdariffa* es limitada, algunos estudios han identificado componentes volátiles en extractos hidroetanólicos, como el ácido (E)-10-octadecenoico metil éster, que actúan como inhibidores competitivos de enzimas bacterianas clave, afectando rutas metabólicas como la biosíntesis de menaquinona y la respiración anaeróbica en *E. coli*. Es plausible que compuestos similares estén presentes en el extracto acetónico, contribuyendo así a su eficacia[124].

En comparación, los antibióticos metronidazol y amoxicilina mostraron inhibiciones bacterianas del 76% y 60%, respectivamente, a concentraciones considerablemente más bajas que las requeridas por los extractos de *H. sabdariffa*. Sin embargo, estudios recientes han indicado que los extractos de esta planta pueden tener una eficacia comparable a la de antibióticos de amplio espectro como el meropenem. Por ejemplo, se ha reportado que el extracto de flor de jamaica mostró una eficacia relativa del 89.7% y 97.97% frente al meropenem en cepas de *E. coli* productoras de beta-lactamasa de espectro extendido (ESBL), lo cual resalta su potencial terapéutico, particularmente en contextos de resistencia antimicrobiana[125].

Los extractos de *H. sabdariffa* contienen una diversidad de compuestos bioactivos, incluyendo flavonoides, antocianinas y ácidos orgánicos, cuya acción combinada o sinérgica podría explicar la eficacia observada, especialmente en los extractos metanólicos y acetónicos.

5.6 Citotoxicidad de los extractos de *H. sabdariffa* en células AGS

Se han realizado diversos estudios sobre los efectos de los extractos de *H. sabdariffa* en células cancerosas, incluyendo células gástricas humanas AGS (Figura 22). Estos estudios sugieren que los extractos pueden inducir apoptosis y, por ende, resultar citotóxicos para las células cancerígenas.



A B

Figura 21. Se muestran las células AGS recién descongeladas (A) y las mismas células en un porcentaje de confluencia del 90% (B) para su criopreservación.

En un inicio, esta investigación contemplaba la realización de un ensayo de adherencia en células AGS infectadas con *H. pylori*, por lo que se decidió seguir la metodología propuesta por Chua y colaboradores, la cual consiste en exponer las células AGS a los extractos durante un periodo de tres horas. Sin embargo, no se contaba con el hecho de que los extractos resultarían citotóxicos para las células, lo cual imposibilitó continuar con el ensayo bajo dichas condiciones (Figura 23).

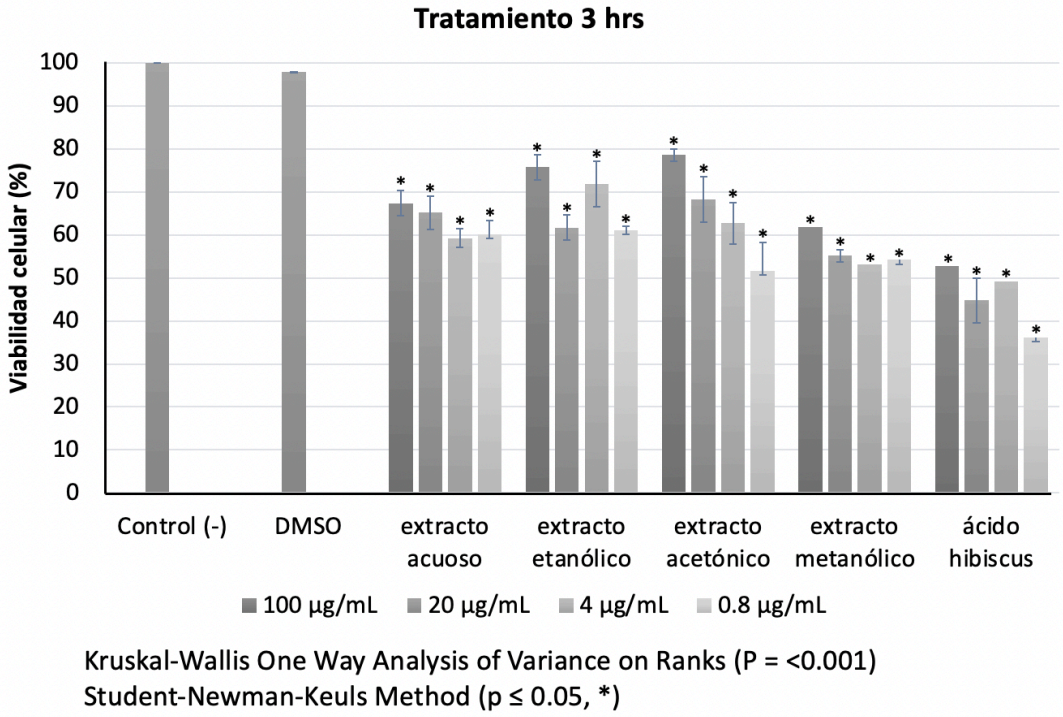


Figura 22. Gráfica de la viabilidad celular (%) de células AGS a partir de un tratamiento en 3 hrs con los diferentes extractos a concentraciones de 100, 20, 4 y 0.8□ /mL

El extracto metanólico mostró una inhibición bacteriana significativa (~85%) a una concentración de 1 mg/mL. Este hallazgo concuerda con estudios que han demostrado la eficacia del extracto metanólico de *H. sabdariffa* contra diversas bacterias. Por ejemplo, se ha reportado que dicho extracto inhibió el crecimiento de *S. aureus* y *E. coli* con zonas de inhibición de 24 mm y 20 mm, respectivamente [61,124,126,127]. La presencia de flavonoides, taninos y otros compuestos fenólicos en el extracto metanólico podría explicar esta actividad, ya que estos metabolitos son conocidos por su capacidad para alterar la integridad de la membrana celular bacteriana.

Asimismo, el extracto acetónico presentó una inhibición bacteriana notable (~50%) incluso a bajas concentraciones (0.04 mg/mL), lo que sugiere la presencia de compuestos bioactivos altamente efectivos. Aunque la literatura específica sobre extractos acetónicos de *H. sabdariffa* es limitada, se han identificado componentes volátiles en extractos hidroetanólicos, como el ácido (E)-10-octadecenoico metil éster, que actúan como inhibidores competitivos de enzimas bacterianas esenciales, afectando rutas clave como la biosíntesis de menaquinona y la

respiración anaeróbica en *E. coli* [123],[128]. Es plausible que compuestos similares estén presentes en el extracto acetónico, contribuyendo a su efecto antimicrobiano.

Por su parte, el metronidazol y la amoxicilina mostraron inhibiciones bacterianas del 76% y 60%, respectivamente, a concentraciones considerablemente menores que los extractos de *H. sabdariffa*. Sin embargo, estudios han señalado que los extractos de jamaica pueden tener una eficacia comparable a antibióticos de amplio espectro como el meropenem. Por ejemplo, se ha reportado que extractos de flor de roselle exhiben una potencia relativa del 89.7% y 97.97% en comparación con meropenem frente a cepas de *E. coli* productoras de beta-lactamasa de espectro extendido (ESBL)[129]. Esto refuerza la posibilidad de que, aunque se requieran dosis más altas, los extractos de *H. sabdariffa* representen alternativas viables en contextos de resistencia antibiótica.

Una vez obtenidos los resultados de citotoxicidad, se consideró el ciclo de crecimiento de las células AGS, las cuales duplican sus colonias aproximadamente cada 24 horas. En función de esto, el siguiente tratamiento experimental se ajustó a un periodo de exposición de 24 horas, con el fin de observar efectos más representativos sobre la viabilidad y morfología celular (Figura 24).

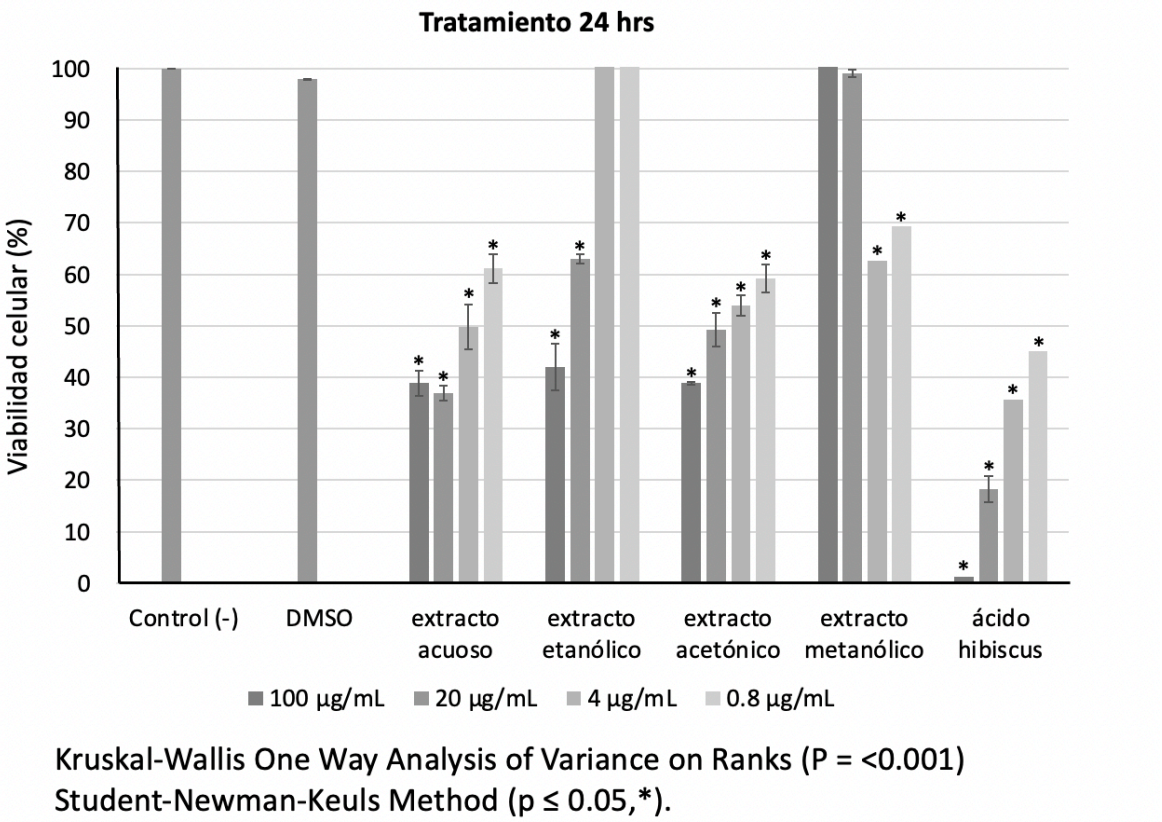


Figura 23. Gráfica de la viabilidad celular (%) de células AGS a partir de un tratamiento en 24 hrs con los diferentes extractos a concentraciones de 100, 20, 4 y 0.8□g /mL

El control negativo y el vehículo (DMSO) mostraron una viabilidad celular muy alta (~98–100%), lo que confirma que el sistema experimental es confiable y que el DMSO no tiene efecto tóxico en las condiciones utilizadas.

El extracto acuoso provocó una disminución significativa en la viabilidad celular, especialmente a la concentración de 100 µg/mL (~40%). La viabilidad aumentó conforme disminuyó la concentración, sugiriendo un efecto citotóxico dependiente de la dosis. Este comportamiento coincide con lo reportado por Mousavi *et al.* (2015), quienes observaron que el extracto acuoso de *Agrostemma githago* inhibió el crecimiento de células AGS con un IC_{50} de 13.51 µg/mL a las 24 horas, induciendo apoptosis y arresto del ciclo celular en fase G1. Asimismo, documentaron que el extracto acuoso de *Alpinia galangal* redujo significativamente la viabilidad de células AGS a concentraciones superiores a 500 µg/mL después de 24 horas de tratamiento, lo que refuerza la existencia de un efecto cocentración-dependiente[130].

El extracto etanólico, en cambio, mostró una viabilidad cercana al 100% en todas las concentraciones evaluadas, lo que indica baja o nula citotoxicidad. Este resultado contrasta con lo reportado por Kang *et al.* (2015), quienes encontraron que el extracto metanólico de *Dictamnus dasycarpus* inducía apoptosis en células AGS mediante la vía intrínseca, activando caspasas y reduciendo la viabilidad de manera dependiente de la dosis[131]. El hallazgo actual sugiere que el extracto etanólico de *H. sabdariffa* no contiene en las concentraciones evaluadas compuestos con alta actividad citotóxica sobre estas células.

El extracto acetónico mostró una reducción moderada en la viabilidad celular, con un patrón también dependiente de la dosis. A 100 µg/mL, la viabilidad fue inferior al 40%, aumentando a concentraciones menores. Aunque no se encontraron estudios específicos con extractos acetónicos de *H. sabdariffa* en células AGS, el comportamiento observado es similar al de otros extractos orgánicos reportados en la literatura, como el metanólico de *D. dasycarpus*, lo que sugiere la posible presencia de compuestos bioactivos con capacidad proapoptótica[131].

El extracto metanólico mostró una respuesta atípica: a concentraciones altas (100 y 20 µg/mL) la viabilidad fue elevada (~100%), mientras que a concentraciones más bajas (4 y 0.8 µg/mL) se observó una disminución visible. Este comportamiento no lineal podría deberse a interferencias experimentales o a la presencia de compuestos con efectos bifásicos. Kang *et al.* (2015) reportaron que extractos metanólicos pueden inducir apoptosis en células AGS en función de la dosis, por lo que no puede descartarse una respuesta compleja dependiente de otros factores[132].

El ácido hibiscus demostró una citotoxicidad marcada, reduciendo casi por completo la viabilidad celular a 100 µg/mL (~0%) y manteniendo una viabilidad inferior al 40% incluso a concentraciones bajas (4 µg/mL). Este efecto fuertemente concentración-dependiente sugiere un mecanismo citotóxico robusto. Resultados similares han sido descritos para compuestos como la hipericina, con un IC_{50} de 1 µg/mL en células AGS a las 24 horas, mediante inducción de apoptosis sin afectar a células normales[133].

Diversos estudios han confirmado la capacidad de los extractos de *H. sabdariffa* para inducir apoptosis en células AGS. En particular, un extracto rico en polifenoles (HPE) mostró un IC_{50} de 0.95 mg/mL, y a 2 mg/mL indujo fragmentación de ADN y un aumento del 52.36% en la fase hipodiploide tras 24 horas de exposición. Estos efectos fueron mediados por la activación de la vía p53 y la cascada p38 MAPK/FasL, lo que indica una apoptosis por vía mitocondrial[134,135,136,137,138,139].

Otro estudio reportó que extractos de flores secas de *H. sabdariffa* inducen apoptosis mediante la fosforilación de c-Jun a través de la vía JNK/p38, facilitando la liberación del citocromo c al citosol y la activación de caspasas[134].

5.6 Modelo *in vivo* para evaluación de los extractos

El modelo de infección en jerbos mongoles (*Meriones unguiculatus*) ha demostrado ser una herramienta experimental robusta y altamente reproducible para el estudio de la patogénesis de *Helicobacter pylori*, así como para la evaluación de terapias antimicrobianas convencionales y tratamientos alternativos basados en compuestos naturales. A diferencia de otros modelos murinos, los jerbos pueden ser colonizados de manera persistente por cepas humanas de *H. pylori* que expresan genes de alta virulencia como *cagA* y *vacA*, lo que les confiere una ventaja significativa al reproducir de manera fiel las lesiones gástricas observadas en humanos. Estas incluyen gastritis crónica activa, metaplasia intestinal, úlceras gástricas y duodenales, e incluso adenocarcinoma gástrico en condiciones de infección prolongada. Esta similitud morfofuncional de la mucosa gástrica entre jerbos y humanos, sumada a la respuesta inmunológica comparable—marcada por la activación de NF-κB y sobreexpresión de citocinas como IL-1β, TNF-α e IL-8—constituye la base para su valor translacional[140,141,142].

Además, la versatilidad del modelo se ha fortalecido mediante la incorporación de factores que incrementan la severidad de las lesiones gástricas, tales como la administración de dietas altas en sal, exposición a compuestos carcinogénicos como MNNG o la inducción de estrés fisiológico, estrategias que permiten emular condiciones clínicas más complejas. Esta capacidad de simular la evolución natural de la infección crónica convierte al jerbo en un modelo idóneo para analizar tanto la

dinámica de colonización bacteriana como la progresión lesional y la eficacia de intervenciones terapéuticas específicas [143,144].

Diversos estudios han empleado este modelo para evaluar extractos de origen vegetal con propiedades antimicrobianas y antiinflamatorias. Por ejemplo, el extracto de hojas de *Wasabia japonica* ha demostrado reducir el daño oxidativo al ADN gástrico y a los eritrocitos en jerbos infectados y sometidos a estrés físico, lo que se evidenció por una disminución significativa de 8-oxodG, un marcador de daño genotóxico. Sekiguchi *et al.* (2018) complementaron estos hallazgos al observar una reducción en la erosión gástrica y la carga bacteriana tras la administración de dicho extracto y de su principio activo, el isotiocianato de alilo. De forma similar, otros compuestos naturales como el ácido 18β-glicirretínico derivado de *Glycyrrhiza glabra* han demostrado efectos comparables a terapias antibióticas al suprimir genes proinflamatorios clave como COX-2, iNOS e IL-1β [145, 146,147,148,149].

La utilidad de este modelo también ha sido explorada con extractos de *Camellia sinensis* (té verde), los cuales mostraron inhibición de la ureasa de *H. pylori in vitro* y redujeron las lesiones gástricas en jerbos tratados con concentraciones de 500 a 2000 ppm durante seis semanas. Asimismo, extractos de *Chenopodium ambrosioides* lograron una eficacia bactericida significativa, comparable a la terapia triple estándar, aunque sin lograr erradicación total en todos los casos, lo que resalta la necesidad de combinar estrategias terapéuticas o ajustar dosis [150,151].

El proceso de infección experimental implica la administración oral de suspensiones bacterianas vivas (10^8–10^9 UFC/mL) durante varios días, con confirmación de colonización mediante cultivo de tejidos gástricos, PCR, tinciones histológicas e inmunohistoquímica. La prueba rápida de ureasa (PRU), aunque cualitativa, es útil como herramienta diagnóstica complementaria. En los ensayos realizados, las tasas de infección logradas oscilaron entre 66.6 % y 68.7 %, con diferencias atribuibles al tipo de inoculo, número de exposiciones y condiciones de aislamiento, como la composición antibiótica del medio de cultivo.

En conjunto, el modelo de jerbo mongol se posiciona como una herramienta clave para estudios preclínicos de infección por *H. pylori*, especialmente útil en la

evaluación de extractos naturales con potencial terapéutico. Su capacidad de simular de forma fiel tanto la patogénesis como la respuesta inmunológica humana, y su versatilidad para adaptarse a distintas condiciones experimentales, lo hacen particularmente valioso para el diseño de estrategias innovadoras contra esta infección de alta prevalencia y relevancia clínica global (Tabla 3).

Tabla 3. Ventajas y limitaciones del modelo en jerbos para el estudio de H. pylori

Categoría	Ventajas	Limitaciones	Bibliografía
Colonización	Alta susceptibilidad a cepas humanas de *H. pylori* sin necesidad de adaptación bacteriana.	Requiere control riguroso de condiciones ambientales (estrés, dieta) para asegurar colonización.	[152]
Lesiones gástricas	Desarrollo de gastritis crónica, metaplasia intestinal y adenocarcinoma, similares al humano.	No todos los animales desarrollan cáncer; se requiere infección prolongada y condiciones específicas.	[153]
Inmunopatología	Expresa citocinas e inflamación semejante al humano (IL-1β, TNF-α, etc.).	Escasa disponibilidad de reactivos inmunológicos específicos para jerbos.	[154]
Versatilidad terapéutica	Útil para evaluar antibióticos, vacunas y extractos de plantas con propiedades terapéuticas.	Dificultad para traducir dosis de extractos naturales a equivalencias clínicas humanas.	[152]
Modelo translacional	Similaridad fisiológica del estómago con humanos; mejor que en ratones o ratas.	Menor disponibilidad comercial; más costoso y complejo que modelos murinos.	[155]
Reproducibilidad	Permite reproducir de manera controlada la progresión de la infección.	Variabilidad individual en la respuesta a la infección o tratamientos.	[156]

En el primer aislamiento realizado a los nueve jerbos no se logró recuperar colonias de *H. pylori*, probablemente debido al nivel de dilución aplicado en el sembrado sobre agar sangre. Además, se observó crecimiento de colonias contaminantes, lo

cual se atribuye al uso limitado de agentes selectivos, ya que el medio solo contenía tres antibióticos: vancomicina, trimetoprim y ácido nalidíxico (Figura 25).

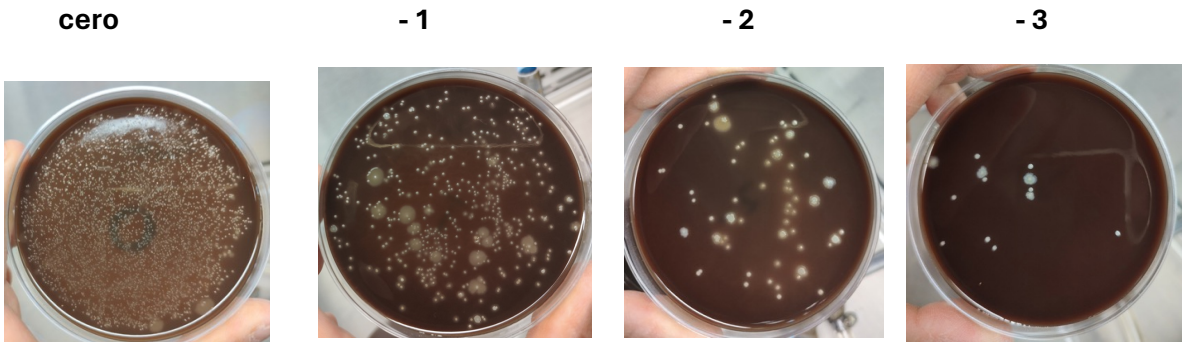


Figura 24. Primer aislamiento de H. pylori del estómago de los jerbos

En el segundo aislamiento realizado a 14 jerbos, se logró recuperar colonias compatibles con *H. pylori* (Figura 26). Además, mediante la prueba rápida de ureasa se confirmó la infección en 11 de los 16 jerbos inoculados, lo que representa una tasa de infección del 68.7 %.

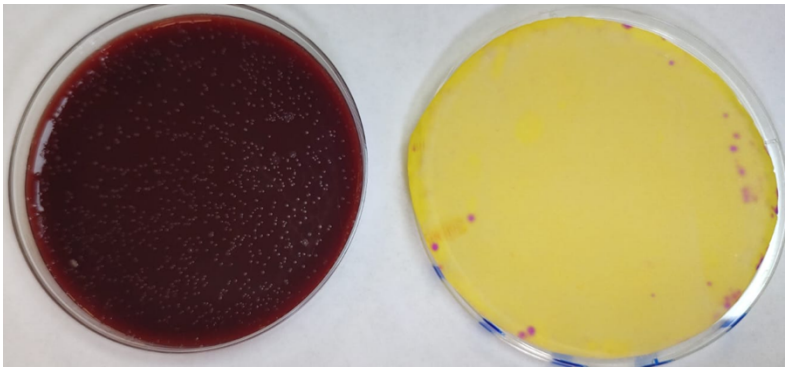


Figura 25. Segundo aislamiento de H. pylori del estómago de los jerbos, utilizando una prueba rápida en disco de papel.

En el tercer aislamiento, que incluyó a nueve jerbos reinoculados con tejido gástrico de animales previamente infectados y posteriormente expuestos tres veces a dosis masivas de *H. pylori*, se obtuvo una tasa de infección del 66.6 % (6 de 9 jerbos). En este caso, se logró recuperar colonias de *H. pylori* en las placas de agar sangre, utilizando únicamente las diluciones 0 y −1, con un volumen de 0.1 mL por placa, suplementadas con 10 % de sangre. (Figura 27).

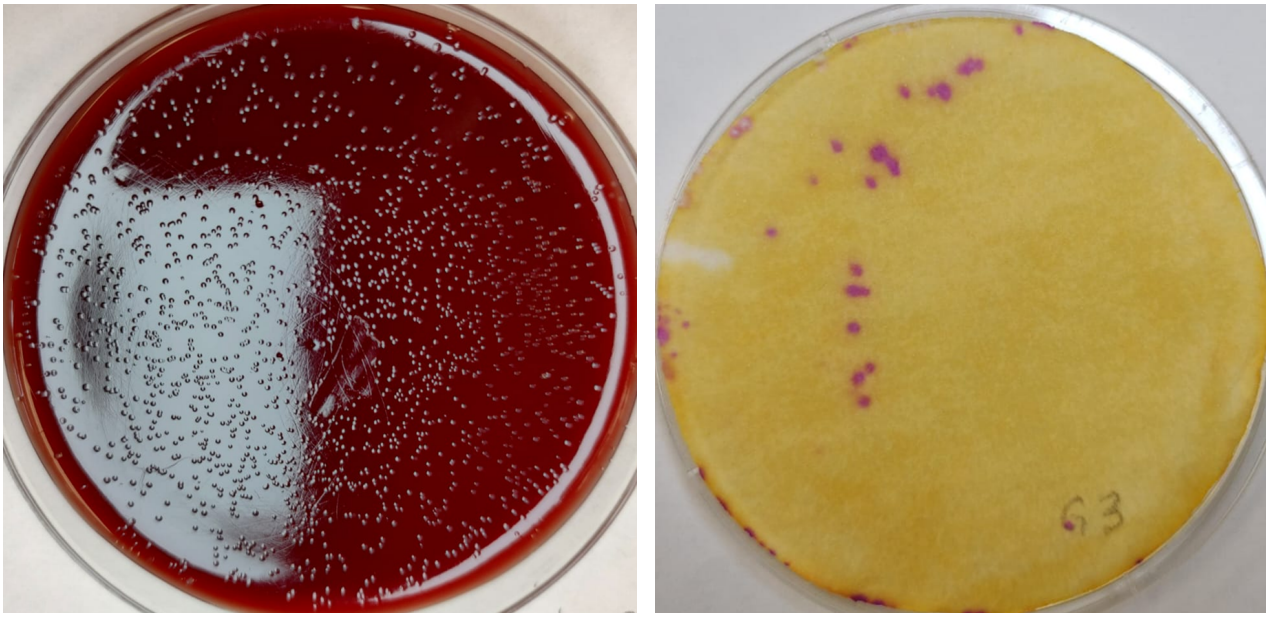


Figura 26. Tercer aislamiento de H. pylori del estómago de los jerbos, utilizando una prueba rápida en disco de papel.

Cabe destacar que, para este aislamiento, se empleó una mezcla de antibióticos compuesta por polimixina, vancomicina, trimetoprim y ácido nalidíxico, con el objetivo de evitar el crecimiento de colonias contaminantes.

El aislamiento exitoso de *H. pylori* a partir de muestras clínicas, como biopsias gástricas, requiere condiciones especializadas debido a sus exigencias nutricionales específicas y su lento crecimiento[157]. Uno de los principales desafíos en el cultivo de *H. pylori* radica en evitar la proliferación de bacterias contaminantes provenientes de la microbiota gástrica o presentes en las propias muestras[158]. Para superar este obstáculo, se utilizan medios de cultivo enriquecidos y selectivos, formulados con una combinación de antibióticos que inhiben el desarrollo de microorganismos no deseados sin comprometer el crecimiento del patógeno objetivo[159].

Entre los medios más utilizados para el aislamiento de *H. pylori* se encuentra el agar sangre, particularmente el agar Columbia suplementado con 5–10 % de sangre desfibrinada de caballo u oveja, que proporciona los nutrientes esenciales para su

crecimiento[160]. A este medio se le adicionan antibióticos específicos para inhibir el desarrollo de microorganismos contaminantes, entre los que destacan:

- Vancomicina: para inhibir bacterias Gram-positivas.
- Polimixina B o colistina: para inhibir algunas Gram-negativas.
- Trimetoprim: que ayuda a suprimir el crecimiento de contaminantes Gram-negativos.
- Anfotericina B o nistatina: para prevenir el crecimiento de hongos.

Esta combinación antibiótica da lugar a medios selectivos, como el medio de Skirrow o el de Dent, los cuales favorecen la recuperación de *H. pylori* al limitar la competencia con otros microorganismos presentes en la muestra[161].

En los modelos experimentales con jerbos mongoles, el aislamiento de *H. pylori* a partir del contenido gástrico o biopsias post mortem es fundamental para confirmar la colonización y evaluar la viabilidad de la cepa tras la infección. Diversos estudios han demostrado que, tras inocular jerbos con cepas clínicas de *H. pylori*, es posible recuperar la bacteria en cultivo incluso semanas después, siempre y cuando se mantengan condiciones microaerofílicas controladas y se utilicen medios selectivos adecuados[152]. El crecimiento bacteriano suele observarse a los 3–7 días, y la morfología característica (colonias translúcidas, redondas y convexas) permite su diferenciación preliminar, que se confirma por pruebas bioquímicas (ureasa, catalasa, oxidasa) y PCR [156].

Interesantemente, se ha observado que la virulencia de *H. pylori* puede aumentar tras sucesivos pasajes en animales infectados. En estudios de pasajes seriados (transplantes consecutivos de microbiota gástrica infectada de un jerbo a otro), las cepas recuperadas mostraron mayor capacidad de colonización, inducían inflamación más severa y tenían una expresión incrementada de genes de virulencia como *cagA* y *vacA* [162,163]. Este fenómeno ha sido interpretado como una adaptación al microambiente gástrico del hospedero, donde las cepas que logran persistir adquieren ventajas selectivas que potencian su patogenicidad. El modelo del jerbo ha sido clave para estudiar esta evolución in vivo, ya que reproduce de forma confiable la progresión de lesiones gástricas similares a las humanas [155].

Además, estos pasajes también parecen influir en la estructura del microbioma gástrico del hospedero. Se ha documentado que la colonización crónica por cepas altamente virulentas puede alterar la composición bacteriana nativa del estómago del jerbo, facilitando la dominancia de *H. pylori* y reduciendo la diversidad microbiana [164]. Estas observaciones refuerzan la utilidad del modelo de jerbo no solo para estudios de patogénesis y evolución bacteriana, sino también para investigar la interacción entre microbiota y patógeno, así como la eficacia de terapias antimicrobianas y probióticas en entornos dinámicos.

Uno de los mecanismos que podría explicar el aumento progresivo de la virulencia de *H. pylori* tras pasajes seriados es la regulación genética mediada por quorum sensing (QS), un sistema de comunicación bacteriana basado en la densidad poblacional. Durante la colonización sostenida en el ambiente gástrico del jerbo, las bacterias acumulan autoinductores que activan rutas de expresión génica asociadas a factores de virulencia, como *cagA*, *vacA*, ureasa y proteínas de adhesión [165]. Este fenómeno no solo facilita la adaptación al microambiente gástrico del nuevo hospedero, sino que también optimiza estrategias colectivas de evasión inmunológica y formación de biofilm, incrementando así la persistencia y patogenicidad de la cepa [166]. Estudios en modelos animales han demostrado que *H. pylori* puede modular la intensidad de su respuesta inflamatoria y su capacidad colonizadora a través de sistemas QS, como los regulados por el gen *luxS*, lo que podría amplificarse con cada pasaje de microbiota en jerbos [167]. Por tanto, el modelo de pasajes seriados no solo selecciona variantes más adaptadas, sino que también puede inducir una regulación epigenética y transcriptómica dependiente del QS, contribuyendo a una evolución acelerada del fenotipo virulento.

6. Conclusiones

Los resultados de este estudio evidencian el potencial terapéutico que poseen los extractos derivados de *Hibiscus sabdariffa*, especialmente el extracto acetónico y el ácido hibiscus, frente a la infección por *Helicobacter pylori* y la proliferación de células cancerígenas gástricas.

En particular, el extracto acetónico mostró una actividad antimicrobiana significativa, destacándose principalmente por su capacidad para inhibir la actividad ureásica, un proceso clave que *H. pylori* utiliza para sobrevivir y colonizar eficazmente el ambiente ácido del estómago. La ureasa facilita la neutralización del pH local al hidrolizar la urea en amoníaco y dióxido de carbono, lo que protege a la bacteria de la acidez gástrica y contribuye a su persistencia crónica. La marcada inhibición observada a concentraciones elevadas del extracto acetónico subraya no solo la eficacia, sino también la importancia de la dosis para maximizar el efecto antimicrobiano, evidenciando un efecto concentración-dependiente que puede ser optimizado en formulaciones terapéuticas futuras.

Por otro lado, el ácido hibiscus demostró una notable actividad citotóxica frente a la línea celular AGS, una línea celular humana representativa del carcinoma gástrico. Este efecto sugiere que el ácido hibiscus induce mecanismos celulares similares a los de compuestos proapoptóticos reconocidos, los cuales promueven la muerte programada de células tumorales, reduciendo así la proliferación y la viabilidad de las mismas. La similitud con estos compuestos sugiere que el ácido hibiscus podría activar rutas intracelulares relacionadas con la apoptosis, como la activación de caspasas o la alteración del equilibrio redox celular, aunque estos mecanismos específicos deberán confirmarse con estudios posteriores. Este hallazgo posiciona al ácido hibiscus como un agente prometedor para el desarrollo de terapias antineoplásicas naturales, complementando los tratamientos convencionales contra el cáncer gástrico.

En cuanto al modelo experimental empleado, la infección por *Helicobacter pylori* en jerbos resultó altamente efectiva para establecer colonización gástrica con tasas de infección consistentes y reproducibles, oscilando entre el 66.6 % y el 68.7 %. Estos valores reflejan la robustez del modelo y su adecuación para simular la infección humana, considerando variables críticas como el tipo de inóculo utilizado, el número de exposiciones y las condiciones específicas del medio de cultivo. La utilización de la prueba rápida de ureasa (PRU) como herramienta diagnóstica complementaria facilitó la detección temprana y confiable de la infección, aportando un método sencillo y rápido para confirmar la presencia bacteriana. Asimismo, la optimización de las condiciones para el aislamiento bacteriano, mediante ajustes en la dilución

del inóculo, el volumen aplicado y la suplementación del agar sangre con antibióticos selectivos, permitió mejorar notablemente la recuperación de colonias compatibles con *H. pylori*. Estos ajustes resultaron cruciales para minimizar el crecimiento de contaminantes y potenciar el aislamiento específico de la bacteria, consolidando la validez del protocolo experimental y estableciendo una base sólida para estudios posteriores de evaluación terapéutica y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos.

En conjunto, los datos obtenidos en este estudio permiten concluir que *Hibiscus sabdariffa* representa una fuente natural con propiedades duales de gran relevancia clínica y científica: por un lado, posee efectos antimicrobianos efectivos contra *H. pylori*, la bacteria implicada en diversas enfermedades gástricas, y por otro, exhibe actividad citotóxica frente a células tumorales gástricas, abriendo la posibilidad de su aplicación tanto en infecciones como en el cáncer gástrico. Esta diferenciación de efectos, atribuible al tipo de extracto utilizado, aporta evidencia experimental sólida que respalda la consideración de *Hibiscus sabdariffa* como un recurso valioso para la investigación y desarrollo de terapias complementarias y alternativas en el manejo de enfermedades gástricas con origen infeccioso y neoplásico. No obstante, si bien estos resultados son altamente prometedores, su traducción clínica efectiva requerirá la realización de estudios adicionales que incluyan ensayos *in vivo* más extensos, análisis toxicológicos, así como investigaciones clínicas que validen la seguridad, dosificación óptima y eficacia terapéutica en pacientes humanos. Además, sería pertinente evaluar si el extracto presenta actividad citotóxica en células sanas, ya que la selectividad frente a células tumorales es esencial para minimizar efectos adversos y garantizar su seguridad clínica,

7. Perspectivas del proyecto

Hibiscus sabdariffa es una planta rica en compuestos bioactivos cuya eficacia depende del tipo de solvente y técnica de extracción utilizada. En particular, el ácido hibiscus extraído con metanol ha mostrado potencial terapéutico contra *Helicobacter pylori*, incluyendo cepas resistentes a antibióticos, gracias a su capacidad para interferir con el crecimiento bacteriano y la virulencia (formación de biopelículas, actividad ureásica).

Aunque sus beneficios son prometedores y su bajo costo, disponibilidad y perfil de seguridad lo hacen atractivo, se requieren estudios adicionales para evaluar su toxicidad, biodisponibilidad, interacciones con medicamentos y eficacia en modelos *in vivo*. La citotoxicidad observada en células AGS podría implicar un potencial antitumoral si se confirma su selectividad y mecanismo (apoptosis, necrosis o autofagia), pero también representa una advertencia si afecta células normales.

El modelo animal del jerbo de Mongolia es útil para evaluar la adaptación y virulencia de *H. pylori*, especialmente tras pasajes seriados, que aumentan la agresividad bacteriana. Este modelo permite probar la eficacia del extracto de *H. sabdariffa* frente a infecciones avanzadas.

Finalmente, se recomienda investigar combinaciones del extracto con antibióticos para reducir dosis y toxicidad, y evaluar si las concentraciones efectivas son seguras para su uso terapéutico oral.

8. Referencias

(1)Öztekin, M.; Yılmaz, B.; Ağagündüz, D.; Capasso, R. Overview of Helicobacter Pylori Infection: Clinical Features, Treatment, and Nutritional Aspects. *Diseases* **2021**, *9* (4), 66. https://doi.org/10.3390/diseases9040066.

(2)Baj, J.; Forma, A.; Sitarz, M.; Portincasa, P.; Garruti, G.; Krasowska, D.; Maciejewski, R. Helicobacter Pylori Virulence Factors—Mechanisms of Bacterial Pathogenicity in the Gastric Microenvironment. *Cells* **2020**, *10* (1), 27. https://doi.org/10.3390/cells10010027.

(3)Villalón F, A.; Reyes P, D.; Ortiz O, J.; Gándara F, V.; Díaz P, L. A.; Chahuán A, J.; Pizarro R, M.; Riquelme P, A. Tratamiento y manejo de la infección por Helicobacter pylori. *Gastroenterol. latinoam.* **2020**, No. 3, 136–146. https://doi.org/10.46613/gastrolat2020003-03.

(4)Alipour, M. Molecular Mechanism of Helicobacter Pylori-Induced Gastric Cancer. *J Gastrointest Canc* **2021**, *52* (1), 23–30. https://doi.org/10.1007/s12029-020-00518-5.

(5)Miller, A. K.; Williams, S. M. Helicobacter Pylori Infection Causes Both Protective and Deleterious Effects in Human Health and Disease. *Genes Immun* **2021**, *22* (4), 218–226. https://doi.org/10.1038/s41435-021-00146-4.

(6)Kayali, S.; Manfredi, M.; Gaiani, F.; Bianchi, L.; Bizzarri, B.; Leandro, G.; Di Mario, F.; de' Angelis, G. L. Helicobacter Pylori, Transmission Routes and Recurrence of Infection: State of the Art. *Acta Bio Medica Atenei Parmensis* **2018**, *89* (8-S), 72–76. https://doi.org/10.23750/abm.v89i8-S.7947.

(7)Hatakeyama, M. Helicobacter Pylori and Gastric Carcinogenesis. *J Gastroenterol* **2009**, *44* (4), 239–248. https://doi.org/10.1007/s00535-009-0014-1.

(8)Chen, Y.-C.; Malfertheiner, P.; Yu, H.-T.; Kuo, C.-L.; Chang, Y.-Y.; Meng, F.-T.; Wu, Y.-X.; Hsiao, J.-L.; Chen, M.-J.; Lin, K.-P.; Wu, C.-Y.; Lin, J.-T.; O'Morain, C.; Megraud, F.; Lee, W.-C.; El-Omar, E. M.; Wu, M.-S.; Liou, J.-M. Global Prevalence of Helicobacter Pylori Infection and Incidence of Gastric Cancer Between 1980 and 2022. *Gastroenterology* **2024**, *166* (4), 605–619. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2023.12.022.

(9)Navashenaq, J. G.; Shabgah, A. G.; Banach, M.; Jamialahmadi, T.; Penson, P. E.; Johnston, T. P.; Sahebkar, A. The Interaction of Helicobacter Pylori with Cancer Immunomodulatory Stromal Cells: New Insight into Gastric Cancer Pathogenesis. *Seminars in Cancer Biology* **2021**, S1044579X21002480. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.09.014.

(10)Wen, J.; Wang, Y.; Gao, C.; Zhang, G.; You, Q.; Zhang, W.; Zhang, Z.; Wang, S.; Peng, G.; Shen, L. Helicobacter Pylori Infection Promotes Aquaporin 3 Expression via the ROS–HIF-1α–AQP3–ROS Loop in Stomach Mucosa: A Potential Novel Mechanism for Cancer Pathogenesis. *Oncogene* **2018**, *37* (26), 3549–3561. https://doi.org/10.1038/s41388-018-0208-1.

(11)Elseweidy, M. M. *Helicobacter Pylori Infection and Its Relevant to Chronic Gastritis*; IntechOpen, 2013. https://doi.org/10.5772/52276.

(12)Zhang, X.-Y.; Zhang, P.-Y.; Aboul-Soud, M. A. M. From Inflammation to Gastric Cancer: Role of Helicobacter Pylori. *Oncology Letters* **2017**, *13* (2), 543–548. https://doi.org/10.3892/ol.2016.5506.

(13)Ansari, S.; Yamaoka, Y. Role of Vacuolating Cytotoxin A in *Helicobacter Pylori* Infection and Its Impact on Gastric Pathogenesis. *Expert Review of Anti-infective Therapy* **2020**, *18* (10), 987–996. https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1782739.

(14)Maeda, M.; Moro, H.; Ushijima, T. Mechanisms for the Induction of Gastric Cancer by Helicobacter Pylori Infection: Aberrant DNA Methylation Pathway. *Gastric Cancer* **2017**, *20* (S1), 8–15. https://doi.org/10.1007/s10120-016-0650-0.

(15)Jiménez-Soto, L. F.; Haas, R. The CagA Toxin of Helicobacter Pylori: Abundant Production but Relatively Low Amount Translocated. *Sci Rep* **2016**, *6* (1), 23227. https://doi.org/10.1038/srep23227.

(16)Albensi, B. C. What Is Nuclear Factor Kappa B (NF-κB) Doing in and to the Mitochondrion? *Front. Cell Dev. Biol.* **2019**, *7*, 154. https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00154.

(17)Muhammad, J.; Eladl, M.; Khoder, G. Helicobacter Pylori-Induced DNA Methylation as an Epigenetic Modulator of Gastric Cancer: Recent Outcomes and Future Direction. *Pathogens* **2019**, *8* (1), 23. https://doi.org/10.3390/pathogens8010023.

(18)Narayanan, M.; Reddy, K. M.; Marsicano, E. Peptic Ulcer Disease and Helicobacter Pylori Infection. *Mo Med* **2018**, *115* (3), 219–224.

(19)Rodríguez Palomo, D.; Alfaro Benavides, A. Actualización de la Fisiología Gástrica. *Medicina Legal de Costa Rica* **2010**, *27* (2), 59–68.

(20)Calam, J. Helicobacter Pylori and Somatostatin Cells. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **1998**, *10* (4), 281–283. https://doi.org/10.1097/00042737-199804000-00001.

(21)Sánchez-Cuén, J. A.; Irineo-Cabrales, A. B.; Bernal-Magaña, G.; Peraza-Garay, F. de J. Regresión de La Metaplasia Intestinal Gástrica Tras La Erradicación de La Infección Por Helicobacter Pylori En Un Hospital de México. *Revista Española de Enfermedades Digestivas* **2016**, *108* (12), 770–775. https://doi.org/10.17235/reed.2016.4194/2016.

(22)awochna. *H. Pylori Prevention*. https://publichealth.arizona.edu/outreach/health-literacy-awareness/hpylori/prevention (accessed 2023-09-20).

(23)Díaz, P.; Valenzuela Valderrama, M.; Bravo, J.; Quest, A. F. G. Helicobacter Pylori and Gastric Cancer: Adaptive Cellular Mechanisms Involved in Disease

Progression. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 5. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00005.

(24)Sitarz, R.; Skierucha, M.; Mielko, J.; Offerhaus, J.; Maciejewski, R.; Polkowski, W. Gastric Cancer: Epidemiology, Prevention, Classification, and Treatment. *CMAR* **2018**, *Volume 10*, 239–248. https://doi.org/10.2147/CMAR.S149619.

(25)Mustafa, M.; Menon, J.; Muniandy, Rk.; Illzam, Em.; Nornazirah, A.; Nang, Mk.; Fairrul, K.; Sharifa, Am. Gastric Cancer:Risk Factors, Diagnosis and Management. *IOSR JDMS* **2017**, *16* (03), 69–74. https://doi.org/10.9790/0853-1603126974.

(26)Yang, J.; Zhou, X.; Liu, X.; Ling, Z.; Ji, F. Role of the Gastric Microbiome in Gastric Cancer: From Carcinogenesis to Treatment. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 641322. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.641322.

(27)Saxena, A.; Mukhopadhyay, A. K.; Nandi, S. P. Helicobacter Pylori: Perturbation and Restoration of Gut Microbiome. *J Biosci* **2020**, *45* (1), 110. https://doi.org/10.1007/s12038-020-00078-7.

(28)Bruno, G.; Rocco, G.; Zaccari, P.; Porowska, B.; Mascellino, M. T.; Severi, C. *Helicobacter Pylori* Infection and Gastric Dysbiosis: Can Probiotics Administration Be Useful to Treat This Condition? *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology* **2018**, *2018*, 1–7. https://doi.org/10.1155/2018/6237239.

(29)Kim, S. Y. Antibiotic Treatment for *Helicobacter Pylori* : Is the End Coming? *WJGPT* **2015**, *6* (4), 183. https://doi.org/10.4292/wjgpt.v6.i4.183.

(30)Hu, Y.; Zhu, Y.; Lu, N.-H. Recent Progress in Helicobacter Pylori Treatment. *Chinese Medical Journal* **2020**, *133* (3), 335–343. https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000618.

(31)Plaza-Diaz, J.; Ruiz-Ojeda, F. J.; Gil-Campos, M.; Gil, A. Mechanisms of Action of Probiotics. *Advances in Nutrition* **2019**, *10* (suppl_1), S49–S66. https://doi.org/10.1093/advances/nmy063.

(32)Homan, M. Are Probiotics Useful in *Helicobacter Pylori* Eradication? *WJG* **2015**, *21* (37), 10644. https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i37.10644.

(33)Yang, Y.-J.; Chuang, C.-C.; Yang, H.-B.; Lu, C.-C.; Sheu, B.-S. Lactobacillus Acidophilus Ameliorates H. Pylori-Induced Gastric Inflammation by Inactivating the Smad7 and NFκB Pathways. *BMC Microbiol* **2012**, *12* (1), 38. https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-38.

(34)Hsieh, P.-S.; Tsai, Y.-C.; Chen, Y.-C.; Teh, S.-F.; Ou, C.-M.; King, V. A.-E. Eradication of *Helicobacter Pylori* Infection by the Probiotic Strains *Lactobacillus Johnsonii* MH-68 and *L. Salivarius* Ssp. *Salicinius* AP-32. *Helicobacter* **2012**, *17* (6), 466–477. https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2012.00992.x.

(35)Lerner, A.; Shoenfeld, Y.; Matthias, T. Probiotics: If It Does Not Help It Does Not Do Any Harm. Really? *Microorganisms* **2019**, *7* (4), 104. https://doi.org/10.3390/microorganisms7040104.

(36)Ngan, L. T. M.; Tan, M. T.; Hoang, N. V. M.; Thanh, D. T.; Linh, N. T. T.; Hoa, T. T. H.; Nuong, N. T. M.; Hieu, T. T. Antibacterial Activity of Hibiscus Rosa-Sinensis L. Red Flower against Antibiotic-Resistant Strains of Helicobacter Pylori and Identification of the Flower Constituents. *Braz J Med Biol Res* **2021**, *54* (7), e10889. https://doi.org/10.1590/1414-431x2020e10889.

(37)Barnum, C. R.; Endelman, B. J.; Shih, P. M. Utilizing Plant Synthetic Biology to Improve Human Health and Wellness. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, 691462. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.691462.

(38)Ngan, L. T. M.; Dung, P. P.; Nhi, N. V. T. Y.; Hoang, N. van M.; Hieu, T. T. Antibacterial Activity of Ethanolic Extracts of Some Vietnamese Medicinal Plants against Helicobacter Pylori; Ho Chi Minh City, Vietnam, 2017; p 020030. https://doi.org/10.1063/1.5000198.

(39)Aziz, F.; Xin, M.; Gao, Y.; Chakroborty, A.; Khan, I.; Monts, J.; Monson, K.; Bode, A. M.; Dong, Z. Induction and Prevention of Gastric Cancer with Combined Helicobacter Pylori and Capsaicin Administration and DFMO Treatment, Respectively. *Cancers* **2020**, *12* (4), 816. https://doi.org/10.3390/cancers12040816.

(40)Laskar, Y. B.; Mazumder, P. B. Insight into the Molecular Evidence Supporting the Remarkable Chemotherapeutic Potential of Hibiscus Sabdariffa L. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2020**, *127*, 110153. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110153.

(41)Caamal Cauich, I.; García Rodríguez, J. F.; Pat Fernández, V. G.; Lorenzo Ambrosio, V. Análisis de La Rentabilidad de La Producción de Flor de Jamaica (Hibiscus Sabdariffa). *Panor. Econ.* **2020**, *28* (2), 94–101. https://doi.org/10.32997/pe-2020-2691.

(42)Juhari, N. H.; Bredie, W. L. P.; Toldam-Andersen, T. B.; Petersen, M. A. Characterization of Roselle Calyx from Different Geographical Origins. *Food Research International* **2018**, *112*, 378–389. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.049.

(43)Jabeur, I.; Pereira, E.; Barros, L.; Calhelha, R. C.; Soković, M.; Oliveira, M. B. P. P.; Ferreira, I. C. F. R. Hibiscus Sabdariffa L. as a Source of Nutrients, Bioactive Compounds and Colouring Agents. *Food Research International* **2017**, *100*, 717–723. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.073.

(44)Nix, A.; Paull, C.; Colgrave, M. Flavonoid Profile of the Cotton Plant, Gossypium Hirsutum: A Review. *Plants* **2017**, *6* (4), 43. https://doi.org/10.3390/plants6040043.

(45)Izquierdo-Vega, J.; Arteaga-Badillo, D.; Sánchez-Gutiérrez, M.; Morales-González, J.; Vargas-Mendoza, N.; Gómez-Aldapa, C.; Castro-Rosas, J.; Delgado-Olivares, L.; Madrigal-Bujaidar, E.; Madrigal-Santillán, E. Organic Acids from Roselle (Hibiscus Sabdariffa L.)—A Brief Review of Its Pharmacological Effects. *Biomedicines* **2020**, *8* (5), 100. https://doi.org/10.3390/biomedicines8050100.

(46)Salem, M. A.; Zayed, A.; Beshay, M. E.; Abdel Mesih, M. M.; Ben Khayal, R. F.; George, F. A.; Ezzat, S. M. Hibiscus Sabdariffa L.: Phytoconstituents, Nutritive, and Pharmacological Applications. *ADV TRADIT MED (ADTM)* **2021**. https://doi.org/10.1007/s13596-020-00542-7.

(47)Thovhogi, N.; Park, E.; Manikandan, E.; Maaza, M.; Gurib-Fakim, A. Physical Properties of CdO Nanoparticles Synthesized by Green Chemistry via Hibiscus Sabdariffa Flower Extract. *Journal of Alloys and Compounds* **2016**, *655*, 314–320. https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2015.09.063.

(48)Sindi, H. A.; Marshall, L. J.; Morgan, M. R. A. Comparative Chemical and Biochemical Analysis of Extracts of Hibiscus Sabdariffa. *Food Chemistry* **2014**, *164*, 23–29. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.097.

(49)Obouayeba, A. P.; Djyh, B.; Diabate, S.; Djaman, J.; Jean David, N.; Koné, M.; Kouakou, T. Phytochemical and Antioxidant Activity of Roselle (Hibiscus Sabdariffa L.) Petal Extracts. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* **2014**, *5*, 1453–1465.

(50)Fitrotunnisa, Q.; Arsianti, A.; Tejaputri, N. A.; Qorina, F. ANTIOXIDATIVE ACTIVITY AND PHYTOCHEMISTRY PROFILE OF HIBISCUS SABDARIFFA HERB EXTRACTS. *Int J App Pharm* **2019**, 29–32. https://doi.org/10.22159/ijap.2019.v11s6.33532.

(51)Al-Hashimi, A. Antioxidant and Antibacterial Activities of Hibiscus Sabdariffa L. Extracts. **2012**, 506–511. https://doi.org/10.5897/AJFS12.099.

(52)Gurrola-Díaz, C. M.; García-López, P. M.; Sánchez-Enríquez, S.; Troyo-Sanromán, R.; Andrade-González, I.; Gómez-Leyva, J. F. Effects of Hibiscus Sabdariffa Extract Powder and Preventive Treatment (Diet) on the Lipid Profiles of Patients with Metabolic Syndrome (MeSy). *Phytomedicine* **2010**, *17* (7), 500–505. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.10.014.

(53)Pacheco Coello, F.; Orosco-Vargas, C.; Peraza-Marrero, M.; Pinto-Catari, I.; Ramirez-Azuaje, D. Effect of an Extract of Hibiscus Sabdariffa L., on Oxidative Stress Induced in Saccharomyces Cerevisiae. *cac* **2020**, *3* (1), 41–46. https://doi.org/10.22206/cac.2020.v3i1.pp41-46.

(54)Formagio, A. S. N.; Ramos, D. D.; Vieira, M. C.; Ramalho, S. R.; Silva, M. M.; Zárate, N. a. H.; Foglio, M. A.; Carvalho, J. E. Phenolic Compounds of *Hibiscus Sabdariffa* and Influence of Organic Residues on Its Antioxidant and Antitumoral Properties. *Braz. J. Biol.* **2015**, *75*, 69–76. https://doi.org/10.1590/1519-6984.07413.

(55)Baena-Santillán, E. S.; Piloni-Martini, J.; Santos-López, E. M.; Gómez-Aldapa, C. A.; Rangel-Vargas, E.; Castro-Rosas, J. Comparison of the Antimicrobial Activity of *Hibiscus Sabdariffa* Calyx Extracts, Six Commercial Types of Mouthwashes, and Chlorhexidine on Oral Pathogenic Bacteria, and the Effect of *Hibiscus Sabdariffa* Extracts and Chlorhexidine on Permeability of the Bacterial Membrane. *Journal of Medicinal Food* **2021**, *24* (1), 67–76.

https://doi.org/10.1089/jmf.2019.0273.

(56)Mohd-Esa, N.; Hern, F. S.; Ismail, A.; Yee, C. L. Antioxidant Activity in Different Parts of Roselle (Hibiscus Sabdariffa L.) Extracts and Potential Exploitation of the Seeds. *Food Chemistry* **2010**, *122* (4), 1055–1060. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.074.

(57)Salazar-González, C.; Vergara-Balderas, F. T.; Ortega-Regules, A. E.; -Beltrán, J. Á. Antioxidant Properties and Color of Hibiscus Sabdariffa Extracts. *Cienc. Inv. Agr.* **2012**, *39* (1), 79–90. https://doi.org/10.4067/S0718-16202012000100006.

(58)Njume, C.; Afolayan, A. J.; Samie, A.; Ndip, R. N. Inhibitory and Bactericidal Potential of Crude Acetone Extracts of *Combretum Molle* (Combretaceae) on Drug-Resistant Strains of *Helicobacter Pylori*. *J Health Popul Nutr* **2011**, *29* (5), 438–445. https://doi.org/10.3329/jhpn.v29i5.8897.

(59)Apáez-Barrios, P.; Pedraza-Santos, M. E.; Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; Rodríguez-Mendoza, M. D. L. N.; Colegio de Posgraduados; Raya-Montaño, Y. A.; Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; Jaén-Contreras, D.; Colegio de Posgraduados. Rendimiento y Concentración de Antocianinas En Hibiscus Sabdariffa L. Con 5 Aplicación Foliar de Micronutrimentos. *rchsh* **2018**. http://dx.doi.org/10.5154doi: 10.515.

(60)Hussein Rassem, H.; Hairul Bin Khamidun, M.; Fazara Md Ali, U.; Hadibarata, T.; Abdullah Alrabie, N. Comprehensive Analysis of Antioxidant and Antibacterial Activities of Water and Methanol Extracts of Hibiscus Flower. *Journal of King Saud University - Science* **2024**, *36* (11), 103506. https://doi.org/10.1016/j.jksus.2024.103506.

(61)Sekar, M.; Hashim, H. N. M.; Fadzil, F. S. A.; Sukaini, S. S. M.; Zukhi, N. N. M.; Nadzri, M. N.; Abdullah, M. S. Antibacterial Activity of the Methanolic Extract of Hibiscus Sabdariffa Leaves and Fruits. *Microbiology Research Journal International* **2015**, 1–6. https://doi.org/10.9734/BMRJ/2015/19142.

(62)Hassan, S. T. S.; Berchová, K.; Majerová, M.; Pokorná, M.; Švajdlenka, E. *In Vitro* Synergistic Effect of *Hibiscus Sabdariffa* Aqueous Extract in Combination with Standard Antibiotics against *Helicobacter Pylori* Clinical Isolates. *Pharmaceutical Biology* **2016**, *54* (9), 1736–1740. https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1126618.

(63)Adadi, P.; Kanwugu, O. N. Potential Application of Tetrapleura Tetraptera and Hibiscus Sabdariffa (Malvaceae) in Designing Highly Flavoured and Bioactive Pito with Functional Properties. *Beverages* **2020**, *6* (2), 22. https://doi.org/10.3390/beverages6020022.

(64)Portillo-Torres, L. A.; Bernardino-Nicanor, A.; Gómez-Aldapa, C. A.; González-Montiel, S.; Rangel-Vargas, E.; Villagómez-Ibarra, J. R.; González-Cruz, L.; Cortés-López, H.; Castro-Rosas, J. Hibiscus Acid and Chromatographic Fractions from Hibiscus Sabdariffa Calyces: Antimicrobial Activity against Multidrug-Resistant Pathogenic Bacteria. *Antibiotics* **2019**, *8* (4), 218.

https://doi.org/10.3390/antibiotics8040218.

(65)Da-Costa-Rocha, I.; Bonnlaender, B.; Sievers, H.; Pischel, I.; Heinrich, M. Hibiscus Sabdariffa L. – A Phytochemical and Pharmacological Review. *Food Chemistry* **2014**, *165*, 424–443. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.002.

(66)Ali, B. H.; Wabel, N. A.; Blunden, G. Phytochemical, Pharmacological and Toxicological Aspects ofHibiscus Sabdariffa L.: A Review. *Phytother. Res.* **2005**, *19* (5), 369–375. https://doi.org/10.1002/ptr.1628.

(67)Wong, P.-K.; Yusof, S.; Mohd Ghazali, H.; Man, Y. B. Physico-Chemical Characteristics of Roselle (Hibiscus Sabdariffa L.). *Nutrition & Food Science* **2002**, *32*, 68–73. https://doi.org/10.1108/00346650210416994.

(68)Delgado-Vargas, F.; Paredes-Lopez, O. Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses / F. Delgado Vargas, O. Paredes López. *Trends Food Sci. Technol.* **2003**, *14*.

(69)Malacrida, A.; Cavalloro, V.; Martino, E.; Costa, G.; Ambrosio, F. A.; Alcaro, S.; Rigolio, R.; Cassetti, A.; Miloso, M.; Collina, S. Anti-Multiple Myeloma Potential of Secondary Metabolites from Hibiscus Sabdariffa—Part 2. *Molecules* **2021**, *26* (21), 6596. https://doi.org/10.3390/molecules26216596.

(70)Maciel, L. G.; do Carmo, M. A. V.; Azevedo, L.; Daguer, H.; Molognoni, L.; de Almeida, M. M.; Granato, D.; Rosso, N. D. Hibiscus Sabdariffa Anthocyanins-Rich Extract: Chemical Stability, in Vitro Antioxidant and Antiproliferative Activities. *Food and Chemical Toxicology* **2018**, *113*, 187–197. https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.053.

(71)Riaz, G.; Chopra, R. A Review on Phytochemistry and Therapeutic Uses of Hibiscus Sabdariffa L. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2018**, *102*, 575–586. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.023.

(72)Subhaswaraj, P.; Sowmya, M.; Bhavana, V.; Dyavaiah, M.; Siddhardha, B. Determination of Antioxidant Activity of Hibiscus Sabdariffa and Croton Caudatus in Saccharomyces Cerevisiae Model System. *J Food Sci Technol* **2017**, *54* (9), 2728–2736. https://doi.org/10.1007/s13197-017-2709-2.

(73)Ademiluyi, A. O.; Oboh, G.; Agbebi, O. J.; Akinyemi, A. J. Anthocyanin - Rich Red Dye of Hibiscus Sabdariffa Calyx Modulates Cisplatin-Induced Nephrotoxicity and Oxidative Stress in Rats. *Int J Biomed Sci* **2013**, *9* (4), 243–248.

(74)Gradinaru, G.; Biliaderis, C. G.; Kallithraka, S.; Kefalas, P.; Garcia-Viguera, C. Thermal Stability of *Hibiscus Sabdariffa* L. Anthocyanins in Solution and in Solid State: Effects of Copigmentation and Glass Transition. *Food Chemistry* **2003**, *83* (3), 423–436. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00125-0.

(75)Widowati, W.; Rani, A.; Hamzah, R.; Arumwardana, S.; Afifah, E.; Kusuma, H.; Rihibiha, D.; Nufus, H.; Amalia, A. Antioxidant and Antiaging Assays of Hibiscus Sabdariffa Extract and Its Compounds. *Natural Product Sciences* **2017**, *23*, 192–

200. https://doi.org/10.20307/nps.2017.23.3.192.

(76)Yagi, S.; Uba, A. I.; Sinan, K. I.; Piatti, D.; Sagratini, G.; Caprioli, G.; Eltigani, S. M.; Lazarova, I.; Zengin, G. Comparative Study on the Chemical Profile, Antioxidant Activity, and Enzyme Inhibition Capacity of Red and White Hibiscus Sabdariffa Variety Calyces. *ACS Omega* **2023**, *8* (45), 42511–42521. https://doi.org/10.1021/acsomega.3c05217.

(77)Desmiaty, Y.; Alatas, F. *Determination of Quercetin in Hibiscus Sabdariffa L. Calyces by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)*; 2008.

(78)Majdoub, Y. O. E.; Ginestra, G.; Mandalari, G.; Dugo, P.; Mondello, L.; Cacciola, F. The Digestibility of Hibiscus Sabdariffa L. Polyphenols Using an In Vitro Human Digestion Model and Evaluation of Their Antimicrobial Activity. *Nutrients* **2021**, *13* (7), 2360. https://doi.org/10.3390/nu13072360.

(79)Abdallah, E. M. Antibacterial Activity of Hibiscus Sabdariffa L. Calyces against Hospital Isolates of Multidrug Resistant Acinetobacter Baumannii. *Journal of Acute Disease* **2016**, *5* (6), 512–516. https://doi.org/10.1016/j.joad.2016.08.024.

(80)Lim, H.-W.; Seo, K.-H.; Chon, J.-W.; Song, K.-Y. Antimicrobial Activity of Hibiscus Sabdariffa L. (Roselle) Powder against Food-Borne Pathogens Present in Dairy Products: Preliminary Study. *J. Dairy Sci. Biotechnol.* **2020**, *38* (1), 37–44. https://doi.org/10.22424/jdsb.2020.38.1.37.

(81)Gutiérrez-Alcántara, E. J.; Gómez-Aldapa, C. A.; Román-Gutiérrez, A. D.; Rangel-Vargas, E.; González-Olivares, L. G.; Castro-Rosas, J. Antimicrobial Activity of Roselle Hibiscus Sabdariffa Calyx Extracts on Culture Media and Carrots Against Multidrug-Resistant Salmonella Strains Isolated from Raw Carrots. *Journal of Food Safety* **2016**, *36* (4), 450–458. https://doi.org/10.1111/jfs.12259.

(82)Cortes-López, H.; Castro-Rosas, J.; García-Contreras, R.; Rodríguez-Zavala, J. S.; González-Pedrajo, B.; Díaz-Guerrero, M.; Hernández-Morales, J.; Muñoz-Cazares, N.; Soto-Hernández, M.; Ruíz-Posadas, L. D. M.; Castillo-Juárez, I. Antivirulence Activity of a Dietary Phytochemical: Hibiscus Acid Isolated from Hibiscus Sabdariffa L. Reduces the Virulence of Pseudomonas Aeruginosa in a Mouse Infection Model. *J Med Food* **2021**, *24* (9), 934–943. https://doi.org/10.1089/jmf.2020.0135.

(83)Liu, W.; Hsu, C.; Yin, M. In Vitro Anti-Helicobacter Pylori Activity of Diallyl Sulphides and Protocatechuic Acid. *Phytother. Res.* **2008**, *22* (1), 53–57. https://doi.org/10.1002/ptr.2259.

(84)Castillo-Juárez, I.; González, V.; Jaime-Aguilar, H.; Martínez, G.; Linares, E.; Bye, R.; Romero, I. Anti-Helicobacter Pylori Activity of Plants Used in Mexican Traditional Medicine for Gastrointestinal Disorders. *Journal of Ethnopharmacology* **2009**, *122* (2), 402–405. https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.12.021.

(85)León-Buitimea, A.; Garza-Cárdenas, C. R.; Garza-Cervantes, J. A.; Lerma-Escalera, J. A.; Morones-Ramírez, J. R. The Demand for New Antibiotics:

Antimicrobial Peptides, Nanoparticles, and Combinatorial Therapies as Future Strategies in Antibacterial Agent Design. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1669. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01669.

(86)Shen, C.-Y.; Zhang, T.-T.; Zhang, W.-L.; Jiang, J.-G. Anti-Inflammatory Activities of Essential Oil Isolated from the Calyx of Hibiscus Sabdariffa L. *Food Funct.* **2016**, *7* (10), 4451–4459. https://doi.org/10.1039/C6FO00795C.

(87)Ju, Z.; Li, M.; Xu, J.; Howell, D. C.; Li, Z.; Chen, F.-E. Recent Development on COX-2 Inhibitors as Promising Anti-Inflammatory Agents: The Past 10 Years. *Acta Pharm Sin B* **2022**, *12* (6), 2790–2807. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.01.002.

(88)Liu, T.; Zhang, L.; Joo, D.; Sun, S.-C. NF-κB Signaling in Inflammation. *Signal Transduct Target Ther* **2017**, *2*, 17023-. https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23.

(89)Li, X.; Li, C.; Zhang, W.; Wang, Y.; Qian, P.; Huang, H. Inflammation and Aging: Signaling Pathways and Intervention Therapies. *Sig Transduct Target Ther* **2023**, *8* (1), 1–29. https://doi.org/10.1038/s41392-023-01502-8.

(90)Sogo, T.; Terahara, N.; Hisanaga, A.; Kumamoto, T.; Yamashiro, T.; Wu, S.; Sakao, K.; Hou, D.-X. Anti-Inflammatory Activity and Molecular Mechanism of Delphinidin 3-Sambubioside, a Hibiscus Anthocyanin. *Biofactors* **2015**, *41* (1), 58–65. https://doi.org/10.1002/biof.1201.

(91)van Meerloo, J.; Kaspers, G. J. L.; Cloos, J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In *Cancer Cell Culture*; Cree, I. A., Ed.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2011; Vol. 731, pp 237–245. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20.

(92)Mitchell, J. P.; Carmody, R. J. NF-κB and the Transcriptional Control of Inflammation. *Int Rev Cell Mol Biol* **2018**, *335*, 41–84. https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2017.07.007.

(93)van Loo, G.; Bertrand, M. J. M. Death by TNF: A Road to Inflammation. *Nat Rev Immunol* **2023**, *23* (5), 289–303. https://doi.org/10.1038/s41577-022-00792-3.

(94)Zhao, H.; Wu, L.; Yan, G.; Chen, Y.; Zhou, M.; Wu, Y.; Li, Y. Inflammation and Tumor Progression: Signaling Pathways and Targeted Intervention. *Signal Transduct Target Ther* **2021**, *6* (1), 263. https://doi.org/10.1038/s41392-021-00658-5.

(95)Mohsin, N.-A.; Irfan, M. Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors: A Review of Recent Chemical Scaffolds with Promising Anti-Inflammatory and COX-2 Inhibitory Activities. *Med Chem Res* **2020**, *29* (5), 809–830. https://doi.org/10.1007/s00044-020-02528-1.

(96)Kaminska, B. MAPK Signalling Pathways as Molecular Targets for Anti-Inflammatory Therapy--from Molecular Mechanisms to Therapeutic Benefits. *Biochim Biophys Acta* **2005**, *1754* (1–2), 253–262. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.08.017.

(97)Kim, E. K.; Choi, E.-J. Pathological Roles of MAPK Signaling Pathways in Human Diseases. *Biochim Biophys Acta* **2010**, *1802* (4), 396–405. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.12.009.

(98)Saklatvala, J. The P38 MAP Kinase Pathway as a Therapeutic Target in Inflammatory Disease. *Curr Opin Pharmacol* **2004**, *4* (4), 372–377. https://doi.org/10.1016/j.coph.2004.03.009.

(99)Papi, S.; Ahmadizar, F.; Hasanvand, A. The Role of Nitric Oxide in Inflammation and Oxidative Stress. *Immunopathologia Persa* **2019**, *5*, e08–e08. https://doi.org/10.15171/ipp.2019.08.

(100)Spiller, F.; Oliveira Formiga, R.; Fernandes Da Silva Coimbra, J.; Alves-Filho, J. C.; Cunha, T. M.; Cunha, F. Q. Targeting Nitric Oxide as a Key Modulator of Sepsis, Arthritis and Pain. *Nitric Oxide* **2019**, *89*, 32–40. https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.04.011.

(101)Prescott, S. M.; Fitzpatrick, F. A. Cyclooxygenase-2 and Carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **2000**, *1470* (2), M69–M78. https://doi.org/10.1016/S0304-419X(00)00006-8.

(102)Martínez-Limón, A.; Joaquin, M.; Caballero, M.; Posas, F.; de Nadal, E. The P38 Pathway: From Biology to Cancer Therapy. *IJMS* **2020**, *21* (6), 1913. https://doi.org/10.3390/ijms21061913.

(103)Kao, E.-S.; Hsu, J.-D.; Wang, C.-J.; Yang, S.-H.; Cheng, S.-Y.; Lee, H.-J. Polyphenols Extracted from *Hibiscus Sabdariffa* L. Inhibited Lipopolysaccharide-Induced Inflammation by Improving Antioxidative Conditions and Regulating *Cyclooxygenase* -2 Expression. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2009**, *73* (2), 385–390. https://doi.org/10.1271/bbb.80639.

(104)Wang, X.; Bove, A. M.; Simone, G.; Ma, B. Molecular Bases of VEGFR-2-Mediated Physiological Function and Pathological Role. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 599281. https://doi.org/10.3389/fcell.2020.599281.

(105)Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Fuchs, H. E.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2021. *CA A Cancer J. Clin.* **2021**, *71* (1), 7–33. https://doi.org/10.3322/caac.21654.

(106)Siamof, C. M.; Goel, S.; Cai, W. Moving Beyond the Pillars of Cancer Treatment: Perspectives From Nanotechnology. *Front. Chem.* **2020**, *8*, 598100. https://doi.org/10.3389/fchem.2020.598100.

(107)Abbas, Z.; Rehman, S. An Overview of Cancer Treatment Modalities. In *Neoplasm*; Shahzad, H. N., Ed.; InTech, 2018. https://doi.org/10.5772/intechopen.76558.

(108)Chiaino, E.; Micucci, M.; Budriesi, R.; Mattioli, L. B.; Marzetti, C.; Corsini, M.; Frosini, M. Hibiscus Flower and Olive Leaf Extracts Activate Apoptosis in SH-SY5Y Cells. *Antioxidants* **2021**, *10* (12), 1962. https://doi.org/10.3390/antiox10121962.

(109)Arévalo, L. M.; Yarce, C. J.; Oñate-Garzón, J.; Salamanca, C. H. Decrease of Antimicrobial Resistance through Polyelectrolyte-Coated Nanoliposomes Loaded with β-Lactam Drug. *Pharmaceuticals* **2018**, *12* (1), 1. https://doi.org/10.3390/ph12010001.

(110)Simaratanamongkol, A.; Umehara, K.; Noguchi, H.; Panichayupakaranant, P. Identification of a New Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Inhibitor from Thai Edible Plants. *Food Chemistry* **2014**, *165*, 92–97. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.080.

(111)Venegas, A.; Hantar Touma, J.; Bravo, J.; Perez-Perez, G. Progress in Use of Natural Products and Their Active Components against <I>Helicobacter Pylori</I> *AiM* **2016**, *06* (14), 1091–1129. https://doi.org/10.4236/aim.2016.614101.

(112)Njume, C.; Jide, A. A.; Ndip, R. N. Aqueous and Organic Solvent-Extracts of Selected South African Medicinal Plants Possess Antimicrobial Activity against Drug-Resistant Strains of Helicobacter Pylori: Inhibitory and Bactericidal Potential. *IJMS* **2011**, *12* (9), 5652–5665. https://doi.org/10.3390/ijms12095652.

(113)Sachs, G.; Scott, D. R.; Weeks, D. L.; Rektorscheck, M.; Melchers, K. Regulation of Urease for Acid Habitation. In *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*; Mobley, H. L., Mendz, G. L., Hazell, S. L., Eds.; ASM Press: Washington (DC), 2001.

(114)Stingl, K.; Altendorf, K.; Bakker, E. P. Acid Survival of *Helicobacter Pylori*: How Does Urease Activity Trigger Cytoplasmic pH Homeostasis? *Trends in Microbiology* **2002**, *10* (2), 70–74. https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02287-9.

(115)Zhou, J.-T.; Li, C.-L.; Tan, L.-H.; Xu, Y.-F.; Liu, Y.-H.; Mo, Z.-Z.; Dou, Y.-X.; Su, R.; Su, Z.-R.; Huang, P.; Xie, J.-H. Inhibition of Helicobacter Pylori and Its Associated Urease by Palmatine: Investigation on the Potential Mechanism. *PLOS ONE* **2017**, *12* (1), e0168944. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168944.

(116)Woo, H. J.; Yang, J. Y.; Lee, P.; Kim, J.-B.; Kim, S.-H. Zerumbone Inhibits Helicobacter Pylori Urease Activity. *Molecules* **2021**, *26* (9), 2663. https://doi.org/10.3390/molecules26092663.

(117)Amin, M.; Anwar, F.; Naz, F.; Mehmood, T.; Saari, N. Anti-Helicobacter Pylori and Urease Inhibition Activities of Some Traditional Medicinal Plants. *Molecules* **2013**, *18* (2), 2135–2149. https://doi.org/10.3390/molecules18022135.

(118)Salehi, B.; Sharopov, F.; Martorell, M.; Rajkovic, J.; Ademiluyi, A. O.; Sharifi-Rad, M.; Fokou, P. V. T.; Martins, N.; Iriti, M.; Sharifi-Rad, J. Phytochemicals in Helicobacter Pylori Infections: What Are We Doing Now? *Int J Mol Sci* **2018**, *19* (8), 2361. https://doi.org/10.3390/ijms19082361.

(119)Olivieri, R.; Bugnoli, M.; Armellini, D.; Bianciardi, S.; Rappuoli, R.; Bayeli, P. F.; Abate, L.; Esposito, E.; de Gregorio, L.; Aziz, J. Growth of Helicobacter Pylori in Media Containing Cyclodextrins. *J Clin Microbiol* **1993**, *31* (1), 160–162.

https://doi.org/10.1128/jcm.31.1.160-162.1993.

(120)Douraghi, M.; Kashani, S. S.; Zeraati, H.; Esmaili, M.; Oghalaie, A.; Mohammadi, M. Comparative Evaluation of Three Supplements for Helicobacter Pylori Growth in Liquid Culture. *Curr Microbiol* **2010**, *60* (4), 254–262. https://doi.org/10.1007/s00284-009-9534-4.

(121)Marchini, A.; d'Apolito, M.; Massari, P.; Atzeni, M.; Copass, M.; Olivieri, R. Cyclodextrins for Growth ofHelicobacter Pylori and Production of Vacuolating Cytotoxin. *Arch. Microbiol.* **1995**, *164* (4), 290–293. https://doi.org/10.1007/BF02529963.

(122)Nnachetam, U. V.; Florence, O.-N.; Charity, O.-N.; Pius, E. Phytochemical Constituents and Antibacterial Activities of Hibiscus Sabdariffa L. Calyces (Zobo Flower) Extracts on Escherichia Coli and Staphylococcus Aureus. *Journal of Health Sciences & Research* **2020**, *11* (1), 12–16. https://doi.org/10.5005/jp-journals-10042-1092.

(123)Garbi, M. I.; Saleh, M. S.; Badri, A. M.; Ibrahim, I. T.; Mohammed, S. F.; Alhassan, M. S.; Elshikh, A. A.; Kabbashi, A. S. Antibacterial Activity, Phytochemical Screening and Cytotoxicity of Hibiscus Sabdariffa (Calyx). *Advancement in Medicinal Plant Research* **2016**, *4* (4), 116–121.

(124)Ghaly, H. K. F.; Younis, F. A. A.-Y.; Soliman, A. M.; El-Sabbagh, S. M. Phytochemical and Antibacterial Properties of Calyces Hibiscus Sabdariffa L.: An in Vitro and in Silico Multitarget-Mediated Antibacterial Study. *BMC Complementary Medicine and Therapies* **2025**, *25* (1), 62. https://doi.org/10.1186/s12906-025-04794-1.

(125)Fathoni, M. M.; Isnaeni, I.; Darmawati, A. Anti-Bacterial Activity of Rosela Flower Extract (Hibiscus Sabdariffa L.) against Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Eschericia Coli. *Berkala Ilmiah Kimia Farmasi* **2021**, *8* (1), 7–13. https://doi.org/10.20473/bikfar.v8i1.31204.

(126)Venkatesan, K.; Venkatesan, S.; Manivannan, N. Antibacterial Activity of Hibiscus Sabdariffa (Rosella) Using Methanolic Extract. *J Pharm Bioallied Sci* **2024**, *16* (Suppl 2), S1191–S1194. https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs_527_23.

(127)Fullerton, M.; Khatiwada, J.; Johnson, J. U.; Davis, S.; Williams, L. L. Determination of Antimicrobial Activity of Sorrel (Hibiscus Sabdariffa) on Esherichia Coli O157:H7 Isolated from Food, Veterinary, and Clinical Samples. *J Med Food* **2011**, *14* (9), 950–956. https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0200.

(128)Jung, E.; Kim, Y.; Joo, N. Physicochemical Properties and Antimicrobial Activity of Roselle (Hibiscus Sabdariffa L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2013**, *93* (15), 3769–3776. https://doi.org/10.1002/jsfa.6256.

(129)Bariyyah, S. K.; Prajitno, A.; Yuniarti, A. Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of Roselle (Hibiscus Sabdariffa L.) Flower Extract Against Aeromonas Hydrophila. *The Journal of Experimental Life Science* **2019**, *9* (2), 65–

69. https://doi.org/10.21776/ub.jels.2019.009.02.01.

(130)Bohlooli, S.; Bohlooli, S.; Aslanian, R.; Nouri, F.; Teimourzadeh, A. Aqueous Extract of Agrostemma Githago Seed Inhibits Caspase-3 and Induces Cell-Cycle Arrest at G1 Phase in AGS Cell Line. *J Ethnopharmacol* **2015**, *175*, 295–300. https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.07.010.

(131)Park, H. S.; Hong, N. R.; Ahn, T. S.; Kim, H.; Jung, M. H.; Kim, B. J. Apoptosis of AGS Human Gastric Adenocarcinoma Cells by Methanolic Extract of Dictamnus. *Pharmacogn Mag* **2015**, *11* (Suppl 2), S329–S336. https://doi.org/10.4103/0973-1296.165994.

(132)Broekaert, N.; Devreese, M.; De Baere, S.; De Backer, P.; Croubels, S. Modified Fusarium Mycotoxins Unmasked: From Occurrence in Cereals to Animal and Human Excretion. *Food and Chemical Toxicology* **2015**, *80*, 17–31. https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.02.015.

(133)Naderi, M.; Rahmani Cherati, M.; Mohammadian, A.; Baghery Bidhendy, M.; Ghiasvand, S.; Zare Marzouni, H.; Aryan, H.; Jangholi, E.; Javidi, M. A. Hypericin Induces Apoptosis in AGS Cell Line with No Significant Effect on Normal Cells. *Iran J Pharm Res* **2020**, *19* (3), 349–357. https://doi.org/10.22037/ijpr.2019.14904.12735.

(134)Yasmin, R.; Gogoi, S.; Bora, J.; Chakraborty, A.; Dey, S.; Ghaziri, G.; Bhattacharjee, S.; Singh, L. H. Novel Insight into the Cellular and Molecular Signalling Pathways on Cancer Preventing Effects of Hibiscus Sabdariffa: A Review. *J Cancer Prev* **2023**, *28* (3), 77–92. https://doi.org/10.15430/JCP.2023.28.3.77.

(135)Al-Snafi, A. Pharmacological and Therapeutic Importance of Hibiscus Sabdariffa-A Review. *International Journal of Pharmaceutical Research* **2018**, *10*, 451–475.

(136)Brunold, C.; Deters, A.; Knoepfel-Sidler, F.; Hafner, J.; Müller, B.; Hensel, A. Polysaccharides from Hibiscus Sabdariffa Flowers Stimulate Proliferation and Differentiation of Human Keratinocytes. *Planta Med* **2004**, *70* (4), 370–373. https://doi.org/10.1055/s-2004-818952.

(137)Malar, D. S.; Prasanth, M. I.; Verma, K.; Prasansuklab, A.; Tencomnao, T. Hibiscus Sabdariffa Extract Protects HaCaT Cells against Phenanthrene-Induced Toxicity through the Regulation of Constitutive Androstane Receptor/Pregnane X Receptor Pathway. *Nutrients* **2022**, *14* (18), 3829. https://doi.org/10.3390/nu14183829.

(138)Chiu, C.-T.; Chen, J.-H.; Chou, F.-P.; Lin, H.-H. Hibiscus Sabdariffa Leaf Extract Inhibits Human Prostate Cancer Cell Invasion via Down-Regulation of Akt/NF-κB/MMP-9 Pathway. *Nutrients* **2015**, *7* (7), 5065–5087. https://doi.org/10.3390/nu7075065.

(139)Hasi, R. Y.; Ali, H.; Islam, M.; Habib, R.; Satter, M. A.; Yeasmin, T.

Antioxidant and Antineoplastic Activities of Roots of Hibiscus Sabdariffa Linn. Against Ehrlich Ascites Carcinoma Cells. *Clinical Phytoscience* **2019**, *5* (1), 46. https://doi.org/10.1186/s40816-019-0147-6.

(140)Noto, J. M.; Romero-Gallo, J.; Piazuelo, M. B.; Peek, R. M. The Mongolian Gerbil: A Robust Model of Helicobacter Pylori-Induced Gastric Inflammation and Cancer. *Methods Mol Biol* **2016**, *1422*, 263–280. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3603-8_24.

(141)Ohnita, K.; Isomoto, H.; Honda, S.; Wada, A.; Wen, C.-Y.; Nishi, Y.; Mizuta, Y.; Hirayama, T.; Kohno, S. Helicobacter Pylori Strain-Specific Modulation of Gastric Inflammation in Mongolian Gerbils. *World J Gastroenterol* **2005**, *11* (10), 1549–1553. https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i10.1549.

(142)Martínez-Carrillo, D. N.; Atrisco-Morales, J.; Hernández-Pando, R.; Reyes-Navarrete, S.; Betancourt-Linares, R.; Cruz-del Carmen, I.; Illades Aguiar, B.; Román-Román, A.; Fernández-Tilapa, G. Diversidad de los genotipos vacA y cagA de Helicobacter pylori y expresión de interferón gamma en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico. *Revista de Gastroenterología de México* **2014**, *79* (4), 220–228. https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2014.10.003.

(143)Lamb, A.; Chen, L.-F. Role of the Helicobacter Pylori-Induced Inflammatory Response in the Development of Gastric Cancer. *J Cell Biochem* **2013**, *114* (3), 491–497. https://doi.org/10.1002/jcb.24389.

(144)Gaddy, J. A.; Radin, J. N.; Loh, J. T.; Zhang, F.; Washington, M. K.; Peek, R. M.; Algood, H. M. S.; Cover, T. L. High Dietary Salt Intake Exacerbates Helicobacter Pylori-Induced Gastric Carcinogenesis. *Infect Immun* **2013**, *81* (6), 2258–2267. https://doi.org/10.1128/IAI.01271-12.

(145)Cao, D.; Jiang, J.; You, L.; Jia, Z.; Tsukamoto, T.; Cai, H.; Wang, S.; Hou, Z.; Suo, Y.; Cao, X. The Protective Effects of 18β-Glycyrrhetinic Acid on Helicobacter Pylori-Infected Gastric Mucosa in Mongolian Gerbils. *BioMed Research International* **2016**, *2016* (1), 4943793. https://doi.org/10.1155/2016/4943793.

(146)Masuda, S.; Masuda, H.; Shimamura, Y.; Sugiyama, C.; Takabayashi, F. Improvement Effects of Wasabi (Wasabiajaponica) Leaves and Allyl Isothiocyanate on Stomach Lesions of Mongolian Gerbils Infected with Helicobacter Pylori. *Nat Prod Commun* **2017**, *12* (4), 595–598.

(147)Sekiguchi, H.; Takabayashi, F.; Deguchi, Y.; Masuda, H.; Toyoizumi, T.; Masuda, S.; Kinae, N. Leaf Extract of Wasabia Japonica Relieved Oxidative Stress Induced by Helicobacter Pylori Infection and Stress Loading in Mongolian Gerbils. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2010**, *74* (6), 1194–1199. https://doi.org/10.1271/bbb.90919.

(148)Murakami, M.; Ota, H.; Sugiyama, A.; Ishizone, S.; Maruta, F.; Akita, N.; Okimura, Y.; Kumagai, T.; Jo, M.; Tokuyama, T. Suppressive Effect of Rice Extract on Helicobacter Pylori Infection in a Mongolian Gerbil Model. *J Gastroenterol* **2005**, *40* (5), 459–466. https://doi.org/10.1007/s00535-005-1570-7.

(149)Wahab, S.; Annadurai, S.; Abullais, S. S.; Das, G.; Ahmad, W.; Ahmad, M. F.; Kandasamy, G.; Vasudevan, R.; Ali, M. S.; Amir, M. Glycyrrhiza Glabra (Licorice): A Comprehensive Review on Its Phytochemistry, Biological Activities, Clinical Evidence and Toxicology. *Plants (Basel)* **2021**, *10* (12), 2751. https://doi.org/10.3390/plants10122751.

(150)Matsubara, S.; Shibata, H.; Ishikawa, F.; Yokokura, T.; Takahashi, M.; Sugimura, T.; Wakabayashi, K. Suppression of *Helicobacter Pylori*-Induced Gastritis by Green Tea Extract in Mongolian Gerbils. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2003**, *310* (3), 715–719. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.09.066.

(151)Ye, H.; Liu, Y.; Li, N.; Yu, J.; Cheng, H.; Li, J.; Zhang, X.-Z. Anti-Helicobacter Pylori Activities of Chenopodium Ambrosioides L. in Vitro and in Vivo. *World Journal of Gastroenterology* **2015**, *21* (14), 4178–4183. https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i14.4178.

(152)Hirayama, F.; Takagi, S.; Yokoyama, Y.; Iwao, E.; Ikeda, Y. Establishment of Gastric Helicobacter Pylori Infection in Mongolian Gerbils. *J Gastroenterol* **1996**, *31 Suppl 9*, 24–28.

(153)Tatematsu, M.; Nozaki, K.; Tsukamoto, T. Helicobacter Pylori Infection and Gastric Carcinogenesis in Animal Models. *Gastric Cancer* **2003**, *6* (1), 1–7. https://doi.org/10.1007/s101200300000.

(154)Fox, J. G.; Wang, T. C. Inflammation, Atrophy, and Gastric Cancer. *J Clin Invest* **2007**, *117* (1), 60–69. https://doi.org/10.1172/JCI30111.

(155)Sugiyama, A.; Maruta, F.; Ikeno, T.; Ishida, K.; Kawasaki, S.; Katsuyama, T.; Shimizu, N.; Tatematsu, M. Helicobacter Pylori Infection Enhances N-Methyl-N-Nitrosourea-Induced Stomach Carcinogenesis in the Mongolian Gerbil. *Cancer Res* **1998**, *58* (10), 2067–2069.

(156)Kusters, J. G.; Van Vliet, A. H. M.; Kuipers, E. J. Pathogenesis of *Helicobacter Pylori* Infection. *Clin Microbiol Rev* **2006**, *19* (3), 449–490. https://doi.org/10.1128/CMR.00054-05.

(157)Goodwin, C. S.; Armstrong, J. A. Microbiological Aspects of Helicobacter Pylori (Campylobacter Pylori). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **1990**, *9* (1), 1–13. https://doi.org/10.1007/BF01969526.

(158)Dent, J. C.; McNulty, C. A. Evaluation of a New Selective Medium for Campylobacter Pylori. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **1988**, *7* (4), 555–558. https://doi.org/10.1007/BF01962615.

(159)Skirrow, M. B. Campylobacter Enteritis: A “New” Disease. *Br Med J* **1977**, *2* (6078), 9–11. https://doi.org/10.1136/bmj.2.6078.9.

(160)Hirschl, A. M.; Makristathis, A. Methods to Detect Helicobacter Pylori: From Culture to Molecular Biology. *Helicobacter* **2007**, *12 Suppl 2*, 6–11.

https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2007.00560.x.

(161)Goossens, H.; De Boeck, M.; Coignau, H.; Vlaes, L.; Van Den Borre, C.; Butzler, J. P. Modified Selective Medium for Isolation of Campylobacter Spp. from Feces: Comparison with Preston Medium, a Blood-Free Medium, and a Filtration System. *J Clin Microbiol* **1986**, *24* (5), 840–843. https://doi.org/10.1128/jcm.24.5.840-843.1986.

(162)Mizoshita, T.; Tsukamoto, T.; Takenaka, Y.; Cao, X.; Kato, S.; Kaminishi, M.; Tatematsu, M. Gastric and Intestinal Phenotypes and Histogenesis of Advanced Glandular Stomach Cancers in Carcinogen-treated, Helicobacter Pylori-infected Mongolian Gerbils. *Cancer Sci* **2006**, *97* (1), 38–44. https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2006.00135.x.

(163)Radosz-Komoniewska, H.; Bek, T.; Jóźwiak, J.; Martirosian, G. Pathogenicity of Helicobacter Pylori Infection. *Clin Microbiol Infect* **2005**, *11* (8), 602–610. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01207.x.

(164)Brawner, K. M.; Kumar, R.; Serrano, C. A.; Ptacek, T.; Lefkowitz, E.; Morrow, C. D.; Zhi, D.; Kyanam-Kabir-Baig, K. R.; Smythies, L. E.; Harris, P. R.; Smith, P. D. Helicobacter Pylori Infection Is Associated with an Altered Gastric Microbiota in Children. *Mucosal Immunol* **2017**, *10* (5), 1169–1177. https://doi.org/10.1038/mi.2016.131.

(165)*The Quorum-Sensing Molecule Autoinducer 2 Regulates Motility and Flagellar Morphogenesis in Helicobacter pylori | Journal of Bacteriology*. https://journals.asm.org/doi/10.1128/jb.00246-07 (accessed 2025-07-06).

(166)Cole, S. P.; Harwood, J.; Lee, R.; She, R.; Guiney, D. G. Characterization of Monospecies Biofilm Formation by Helicobacter Pylori. *J Bacteriol* **2004**, *186* (10), 3124–3132. https://doi.org/10.1128/JB.186.10.3124-3132.2004.

(167)Rader, B. A.; Wreden, C.; Hicks, K. G.; Sweeney, E. G.; Ottemann, K. M.; Guillemin, K. Helicobacter Pylori Perceives the Quorum-Sensing Molecule AI-2 as a Chemorepellent via the Chemoreceptor TlpB. *Microbiology (Reading)* **2011**, *157* (Pt 9), 2445–2455. https://doi.org/10.1099/mic.0.049353-0.

Anexos

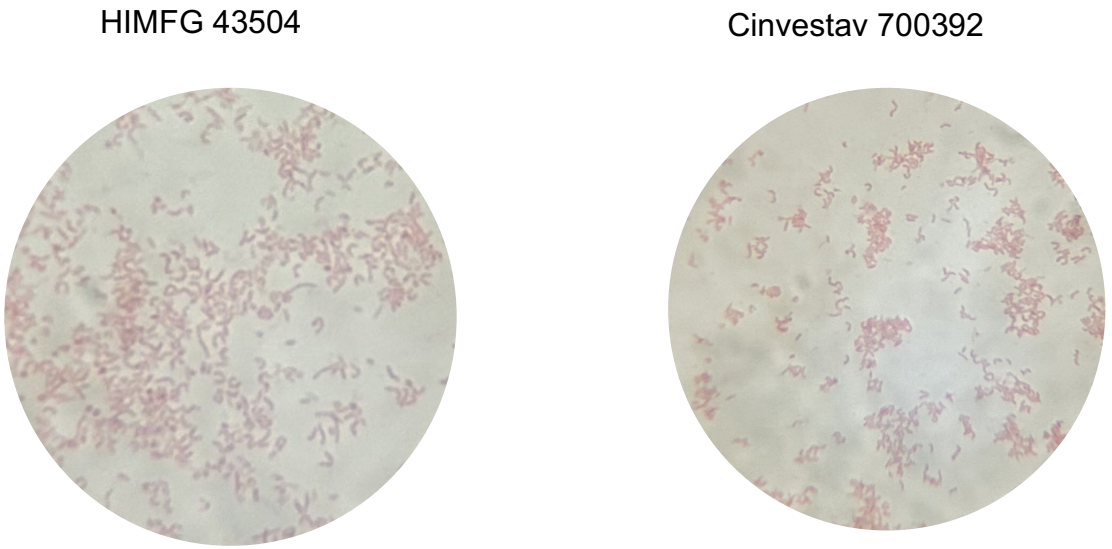


Figura 27. Cepas H. pylori : Cepas utilizadas de H. pylori provenientes del Hospital Infantil de México Federico Gómez "HIMFG" (izquierda) y del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional "CINVESTAV" (derecha).

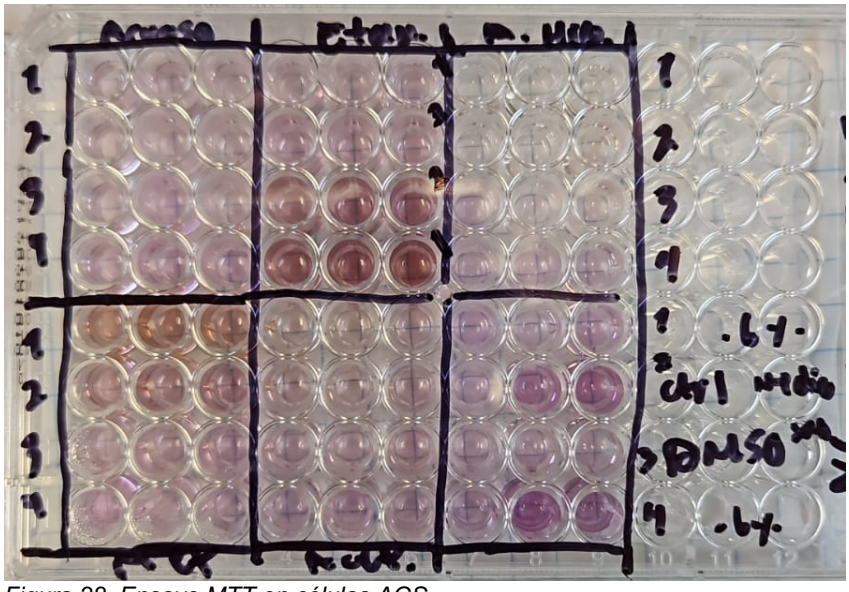


Figura 28. Ensayo MTT en células AGS.

Dirección de Servicios Académicos | Dirección de Bioterio | CICUAL

COMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE LABORATORIO

DICTÁMEN DE EVALUACIÓN

INSTITUTO: Química de Alimentos del Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería (ICBI).	**FOLIO:** CICUAL-V-I/15/2024 **FECHA DE SOLICITUD:** 25/09/2024
PROYECTO: Evaluación del efecto antimicrobiano *In vivo* del extracto acetónico y ácido hibiscus obtenidos de *Hibiscus sabdariffa* contra *Helicobacter pylori*	**RESPONSABLE DEL PROYECTO:** Dr. Javier Castro Rosas **E mail:** jcastro@uaeh.edu.mx **Teléfono:** 7717172000 ext. 40115 5524317723

INVESTIGADORES QUE PARTICIPAN EN EL PROYECTO: Dr. Javier Castro Rosas, Dr. Israel Castillo Juárez

ALUMNOS O PASANTES QUE PARTICIPAN EN EL PROYECTO: M.C. Netzahualcóyol Calcáneo Martínez, M.C. Astrid Espinosa Sánchez, M.C. Antonio Luis García Cordero

ASPECTOS A EVALUAR			SUGERENCIAS
JUSTIFICACIÓN DEL USO DE ANIMALES DE LABORATORIO	X		
BIENESTAR Y ESTRÉS ANIMAL	X		
PROCEDIMIENTOS Y CUIDADOS APLICADOS EN EL ANIMAL	X		
ASPECTOS ÉTICOS DEL PROTOCOLO	X		
PUNTO FINAL Y EUTANASIA	X		
OBSERVACIONES GENERALES			

FECHA DE ÚLTIMA REVISIÓN	NEGADO		FECHA DE APROBACIÓN
29/11/24	APROBADO	x	02/12/2024

Fecha de inicio: 3 de diciembre 2024 **Fecha de término:** 3 de julio 2025

CARACTERÍSTICAS DE LOS ANIMALES QUE SE PROPORCIONARÁN:
Meriones unguiculatus /Etapa 1: 38; Etapa 2: 44/ Hsd: MON */Machos / 50-60 g/ 6-8 semanas*

INVESTIGADOR PRINCIPAL	PRESIDENTE CICUAL	DIRECTOR BIOTERIO
Javier Castro Rosas	Fernanda Navarrete Uribe	Héctor Hernández Domínguez

Figura 29. Aprobación del proyecto in vivo por el CICUAL.