

Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ciencias Médicas

INFORME FINAL

EFECTOS ANTIBACTERIANOS DEL AJO SOBRE H.PYLORI *IN VITRO*

Estudio experimental, Laboratorio Multidisciplinario,

Facultad de Ciencias Médicas,

Universidad de San Carlos de Guatemala

1 de Febrero a 21 de Septiembre 2000

IVÁN E. RASCÓN

9413520

INDICE

I.	Introducción	3
II.	Análisis y Definición	5
III.	Justificación	6
IV.	Objetivos	7
V.	Marco Teórico	8
VI.	Hipótesis	21
VII.	Material y métodos	22
VIII.	Presentación de Resultados	28
IX.	Análisis y Discusión de Resultados	31
X.	Conclusiones	33
XI.	Recomendaciones.....	34
XII.	Resumen	35
XIII.	Bibliografía	36
XIV.	Anexos	41

I. INTRODUCCIÓN

En años recientes la fitoterapia ha tenido un auge en gran escala y las investigaciones para buscar propiedades medicinales a plantas de uso común se han aumentado con la intención de encontrar curas alternativas y baratas a muchas de las enfermedades de las cuales gran parte de la población sufre.

En el año 1982 se descubrió que la bacteria *Helicobacter Pylori* era agente causal de enfermedad péptica; poco después se confirmó que al erradicar esta bacteria en pacientes que la padecían su condición mejoraba notablemente. En aquel entonces se utilizaba un antibiótico combinado con subsalicilato de bismuto. En los años siguientes se observó que la bacteria adquiría resistencia al medicamento con suma facilidad por lo que se tuvo que utilizar combinaciones de triple y cuádruple terapia para lograr su completa erradicación causando una elevación desmedida en los costos de tratamiento.

En tal sentido, el propósito de este estudio es demostrar una forma alternativa de erradicar al *Helicobacter Pylori* con el uso del extracto de ajo solo y combinado con una sal de bismuto para sentar las bases que nos lleven al desarrollo de una terapia más barata y a la vez efectiva contra *H. Pylori*.

Las cepas utilizadas para tal demostración se obtuvieron del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP) las cuales fueron cultivadas en medios no selectivos y expuestas al extracto de ajo a concentración inhibitoria mínima (CIM), al subsalicilato de bismuto a CIM y a ambas sustancias en un 25% de CIM para demostrar la existencia de sinergismo al unir estas dos sustancias. Los resultados de los mismos fueron recabados e interpretados por el bachiller Iván Rascón bajo la supervisión del Dr. Milward Van Tuylen quienes, a través de la observación de Placas de Petri donde no creció la bacteria, concluyeron que sí existía sinergismo entre estas dos sustancias y que la CIM de ambas era la misma descrita en otros estudios; por lo tanto, se recomienda un seguimiento de este estudio primero en animales y por ultimo en pacientes humanos para observar si existe similitud en los resultados entre el estudio hecho *in vitro* y los estudios hechos *in vivo*.

El estudio se realizó en el laboratorio multidisciplinario de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad San Carlos de Guatemala desde el mes Febrero hasta el mes de Septiembre del año 2,000.

II. ANÁLISIS Y DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Para erradicar al *Helicobacter Pylori* es necesario gastar una suma relativamente grande de dinero: Esto significa que aquellas personas que no tienen suficientes recursos económicos para pagar la

antibiótica, o no están afiliados a algún tipo de seguro social están condenados a padecer indefinidamente de enfermedad péptica y expuestos a un alto riesgo de padecer adenocarcinoma gástrico (23). Además no se sabe exactamente cuanto el Estado gasta en tratar a las personas infectadas con esta bacteria, estimándose que es un costo alto debido a que los antibióticos y antiseptores usados son caros y a la alta prevalencia que existe en los hospitales nacionales(3,32).

Se han efectuado estudios experimentales en Holanda demostrando que el ajo tiene actividad antibacteriana contra *H. Pylori*, pero en nuestro país no existen datos y además no se ha comprobado en este país si esos datos son fidedignos. Sabemos que en otros países *H. Pylori* es un problema grande. Por ejemplo, en Estados Unidos el 45% de la población está afectada; en Japón del 62 al 88%; en Polonia 62% y en Italia 87% (20).

El ajo es una planta que se cultiva en nuestro país(4), siendo su precio relativamente barato. Se han realizado estudios demostrando que este tiene actividad antibacteriana contra el *H. Pylori*(31,36). Por tanto, se deben hacer estudios en este país para corroborar lo anterior y también para encontrar una solución a un problema que es de gran magnitud en Guatemala, ya que según estudios anteriores se ha encontrado que casi un 85% de la población en el Hospital Roosevelt, que padece de enfermedad péptica, tiene presencia de anticuerpos anti *H. Pylori* en suero(32); reportando otro estudio, que en el área del distrito de salud de Tecpán, el 61.11% de la población presentaban los anticuerpos(20). Aunque no se tienen datos de todo el país, es muy probable que las estadísticas sean similares para el resto de la población.

III. JUSTIFICACIÓN

En Guatemala, y en cualquier país en vías de desarrollo es de suma importancia encontrar formas alternativas y más baratas para tratar enfermedades que tradicionalmente son costosas de curar. Esto es de especial importancia para la mayoría de familias Guatemaltecas quienes apenas ganan suficiente para obtener la canasta básica.

Además de lo expuesto, también es importante encontrar nuevas formas de atacar al *H. Pylori*, dado a que cada día se hace más y más resistente a los diferentes antibióticos utilizados actualmente. La razón de esto es porque en nuestro país la infección por *H. Pylori* es un problema de alta prevalencia; 85% en el área urbana y 61.11% en el área rural, estando estas personas expuestas a diferentes antibióticos sin saber que están infectados por *H. Pylori*, adquiriendo así la bacteria resistencia a los antibióticos usados para su erradicación.

Finalmente el presente estudio experimental *in vitro* es relativamente reciente en nuestro país y en el mundo, y es nuestro deber como científicos ensayarlo, aunque ya se halla hecho una vez antes, para verificar si los resultados obtenidos anteriormente en otro país son reales.

IV. OBJETIVOS

1. Verificar el efecto antibacteriano del ajo sobre *H. Pylori* *in vitro*.

2. Comparar la actividad antibacteriana contra H. Pylori entre ajo y sales de bismuto *in vitro*.

3. Determinar si existe sinergismo al exponer el Helicobacter Pylori al ajo asociado a sales de bismuto *in vitro*.

V. MARCO TEORICO

A. HELICOBACTER PYLORI:

1. Definición:

Es una bacteria Gram negativa con una forma espiral o en forma de ala de gaviota, de más o menos unos 2.5 a 3.5 micrómetros de longitud, y 0.5 a 1.0 micrómetros de diámetro y una periodicidad de más o menos 1 a 2 micrómetros. Tiene una superficie lisa, y de uno a seis flagelos recubiertos que protruyen de uno de los extremos. Como esta bacteria es morfológicamente parecida a *Campylobacter jejuni*, inicialmente se le llamó *C. Pyloridis*, después *C.Pylori* y por ultimo *H. Pylori*. Este organismo coloniza únicamente la mucosa no secretora de ácido del estómago y no se encuentra donde hay abundantes células parietales; por ende, se puede encontrar más en las porciones del estómago como el antro, cuerpo y cardias cuando hay gastritis atrófica, y adheridos a las células epiteliales gástricas en el duodeno cuando hay metaplasia gástrica(6). Entre las proteínas enzimáticas que esta produce se encuentran las catalasas, proteasas, oxidasa, una proteína termolábil, y una ureasa, estas enzimas parecen ser los causantes de las lesiones en la mucosa.(2,6,20)

2. Historia:

R. Bottcher lo describió por primera vez en 1874 al identificar gérmenes espirales en el estómago de un paciente con cáncer gástrico(20). En el año 1975 se observó que 80% de los pacientes con úlcera gástrica tenían una bacteria Gram negativa en su mucosa gástrica, esto fue algo que no se le puso mucha atención por la comunidad científica(6). En 1982 dos médicos Australianos, Warren y Marshall, cultivaron y demostraron que *H. Pylori* se relacionaba con inflamación gástrica al auto inocularse con un caldo de *H. Pylori*. No fue hasta 1994 que se llegó a un consenso entre la comunidad científica que "*H. Pylori* juega un papel importante como agente causal en la cadena de eventos que llevan a cáncer de estómago, (2,23) y, últimamente, con el análisis de la secuencia del gen 16s RNAr se ha podido encontrar

diferencias importantes, entre *H. Pylori* y otras bacterias relacionadas como lo son las *campilobacters*, las *flexispira* y las *Wolinella*. Estos descubrimientos han llevado a la necesidad de crear un nuevo género como lo son las *Helicobacters* que hasta ahora incluye 8 gástricas, 3 intestinales y 2 hepáticas(6) Por supuesto que estas bacterias no han sido todas encontradas en el cuerpo humano sino en varios diferentes mamíferos. Las únicas dos Helicobacters encontradas en el estómago humano han sido *H. Heilmannii*, también conocida como *Gastrospirillum hominis* y la más común *H. Pylori*.(10,17)

3. Epidemiología:

La bacteria *H. Pylori* tiene una distribución mundial, su infección es independiente de sexo o grupo étnico, por ende se ha encontrado dicha bacteria en el estómago de gente que proviene de todas partes del mundo, sabiéndose también que las personas con nivel socioeconómico bajo son las que mayor riesgo tienen de ser infectadas por esta bacteria, principalmente por el hecho a que están expuestos a condiciones higiénicas no adecuadas. Sin embargo también se ha visto que personas de alto nivel socioeconómico son infectadas por *H. Pylori* pero en menor grado. En los Estados Unidos los estudios de prevalencia han demostrado que las personas mayores de 50 años tuvieron un 50% de probabilidad de padecer de infección por *H. Pylori*, los inmigrantes latinos 60%, los inmigrantes de Europa oriental un 50%, los afro americanos un 40-50%, y los caucásicos menores de 40 años un 20%(30). Se ha encontrado que en adultos hay una mayor prevalencia de infección por la bacteria que en niños, deduciéndose que esto se debe a un riesgo acumulativo durante la vida. El modo de transmisión de *H. Pylori* es poco conocido pero se estima que podría tener una vía hídrica(2,30), rectal-oral, por contacto oral-oral (saliva), descubriéndose en el año 1994 que en el estómago de gatos existía la bacteria y por tanto la posibilidad de una forma zoonótica de transmisión (2,6,30). Los datos epidemiológicos en Guatemala son pocos, pero se cree que la mayoría de los adultos en países en vías de desarrollo, como el nuestro, están infectados por la bacteria si padecen de algún tipo de dispepsia(30).

4. Diagnóstico:

Helicobacter Pylori se puede diagnosticar de varias formas, entre estas por cultivo directo de la misma, en condiciones microaerofilas con 90% de nitrógeno, 5% de oxígeno y 5% de CO₂ y caracterizando las enzimas, ureasa, catalasa y oxidasa(6,20), entre los medios de cultivo no selectivos utilizados se puede mencionar agar de Colombia, Muller-Hinton, y la infusión de cerebro y corazón; entre los selectivos está el Skirrow y Blazer. Entre los obstáculos para el cultivo de la bacteria se relacionan con la obtención de la muestra, lo que lo hace un procedimiento difícil; el transporte de la misma, debido a que es un microorganismo frágil que requiere su transporte en solución salina al 9% a temperatura de 4 grados centígrados, si se transporta a temperatura ambiente su promedio de vida es solo 2 horas(7).

La tinción de Gram. es otra forma diagnóstica de alta especificidad(2), pudiéndose también hacer por tinción de Giemsa, Wharthin-Starry, tinción de plata, genta, eosina y hematoxilina, aunque tienen sus desventajas; lo principal es la obtención de la bacteria, dado a que se requiere endoscopía y biopsia, además que la bacteria sólo coloniza áreas localizadas de la mucosa gástrica, así existiendo la posibilidad de obtener una muestra que no tenga la bacteria presente. Se ha cultivado la bacteria en heces pero es una técnica que aun está en estudio y poco desarrollada(2,7).

También se ha encontrado que el cuerpo produce anticuerpos contra esta bacteria, y por tanto la utilidad de hacer pruebas serológicas como ELISA, para IgA y G constituye una prueba ideal de tamizaje que no requiere hacer endoscopía ni obtener biopsia y, además, tiene buena especificidad y buena sensibilidad, siendo su desventaja no saber con seguridad si la prueba positiva de la persona afectada realmente tiene una enfermedad péptica o si estuvo infectado pero se curó (12).

Otro medio de diagnóstico de importancia, que se hace actualmente, es la prueba de la ureasa por detección de carbono ¹⁴C y ¹³C en el aliento de personas infectadas, después de haber ingerido urea con ¹⁴C y ¹³C. Esta es probablemente la forma menos invasiva que existe para diagnosticar infección por *H. Pylori*, pero su desventaja más grande reside en que no es específica para *H. Pylori* debido a que no

descartar infecciones por otros tipos de Helicobacter como *G. Hominis*; además existen otras bacterias que producen esta enzima como la *Yersinia* y *Proteus*, que también pueden dar un falso positivo(7). Dichas pruebas también son caras aunque el carbono 14 es más barato que el C13 el anterior es radiactivo(7). Últimamente se ha recomendado que las personas tomando tratamiento como inhibidores de la bomba de protones dejen de tomar este tipo de medicamentos, por lo menos dos semanas antes de hacerse el examen de urea en aliento dado a que el tratamiento con inhibidores de la bomba de protones puede negativizar este examen, porque estos medicamentos restringen el crecimiento bacteriano(14). Su costo muy alto y la dificultad para conseguir laboratorios que hacen este examen en Guatemala son también otras desventajas.

5. Fisiopatología:

Cuando la bacteria está presente en el estómago humano se adhiere a la mucosa gástrica a través de una proteína en su superficie conocida como adhesina. En el medio ambiente ácido del estómago esta bacteria no sobreviviría mucho tiempo pero, dado a las enzimas que produce, le es posible resistir en dicho ambiente hostil. La bacteria se encuentra debajo de una capa de moco alcalino que recubre la mucosa. A pesar de esto, el pH del mismo moco es aún muy ácido para ella, por lo tanto, la bacteria produce una enzima que se llama ureasa que degrada la urea, un producto de su propio metabolismo, y la convierte en amonio y bicarbonato: $(\text{C}=\text{O}(\text{NH}_2)_2 + \text{H} + \text{ureasa} \rightarrow 2(\text{NH}_4) + \text{HCO}_3)$; produciendo esta reacción un micro ambiente alcalino que contrarresta la acidez del moco circundante.

A pesar de que se forman anticuerpos contra *H. Pylori*, uno se pregunta por qué las personas infectadas se mantienen infectadas para toda la vida, siendo la respuesta que estas bacterias tienen varios mecanismos de defensa, entre los que se encuentran enzimas que dificultan la fagocitosis, como lo son la catalasa y la superóxido dismutasa, codificadas por los genes *sod* y *KatA* respectivamente (2). Otro mecanismo es su alta variabilidad genética existente entre las diferentes cepas de *H. Pylori*; siendo una de las más importantes formas de evadir el ataque por el sistema inmune el hecho de que *H. Pylori*

produce unas micromoléculas similares a las producidas por el estómago, lo que hace que la bacteria no sea reconocida fácilmente por el sistema inmune. Por otro lado, es muy interesante el hecho de que la molécula que produce *H. Pylori*, parecida a la del cuerpo humano, tenga una similitud en una proteína encontrada en la sangre conocida como antígeno de Lewis, lo que puede ser una pista para dar una respuesta a la observación que solo personas con cierto tipo de sangre padecen más de úlceras que otras. (16).

Dentro de los mecanismos por los cuales la bacteria produce lesión a nivel gástrico se ha identificado la producción de enzimas, como lo son la ureasa que promueve la inflamación y la toxina vacuolizante que produce lesión de células epiteliales(2). Otra teoría que se ha postulado es que la bacteria, al producir moléculas similares a la del cuerpo humano, hace que la misma se reconozca parcialmente y que esto produzca una reacción inmune que ataque a la bacteria, pero también a las células humanas(16,30). También se sabe que el mismo moco donde vive la bacteria es un mecanismo de defensa, debido a que es muy difícil que una célula inmune como macrófagos, neutrofilos, y células T asesinas se movilicen en el moco; pero a pesar de esto la respuesta inmune sigue creciendo, muchos neutrofilos, macrófagos, y células T asesinas mueren de senectud y derraman sus toxinas destructivas sobre las células epiteliales gástricas aumentando así la respuesta inflamatoria(30). En años recientes se ha sugerido que las personas que están infectadas con la bacteria que tiene el gen *cagA* están en mayor riesgo, dado a que este gen y la proteína producida por el mismo son factores determinantes de virulencia, se llegó a esta conclusión cuando se encontró que las personas que tenían este tipo de *H.Pylori*, también presentaron enfermedades gastroenterológicas más severas.(9)

6. Tratamiento:

Como se mencionó anteriormente, *Helicobacter Pylori* es una bacteria difícil de erradicar debido a que se encuentra en un medio ácido que puede contrarrestar a la actividad de muchos antibióticos. Además *H.Pylori*, siempre está en medio de una espesa capa de moco lo que dificulta aun más que los antibióticos lleguen hasta ella, y por último dicha bacteria tiende a hacer resistencia fácilmente a varios antibióticos,

lo que ha hecho que muchas veces la quimioterapia falle, estos fallos ocurren principalmente cuando hay resistencia a los nitroimidazoles o cuando se falla en seguir el régimen (28).

Actualmente, se están usando varios regímenes de quimioterapia para erradicar a esta bacteria; estos regímenes constan del uso de tres tipos de drogas: antibióticos, una sal de bismuto(opcional), y/o un depresor de la secreción de ácido en el estómago. Existen tres tipos de tratamiento: uno de terapia triple, otra de doble, y en casos de resistencia se debe usar cuádruple terapia(11). El régimen de terapia triple consta del uso de dos antibióticos y una sal de bismuto, siendo uno de los más baratos y más eficaces. (90% de erradicación)(3). Otra estrategia que se ha usado con éxito (80% de erradicación) es el uso de una sal de bismuto más amoxicilina y un inhibidor de la bomba de protones, sugerido especialmente cuando hay resistencia a los nitroimidazoles(18). Existe una triple terapia sin uso de sales de bismuto en la cual ésta se reemplaza con un inhibidor de la bomba de protones, que tiene la misma eficacia, pero es más caro(3). La terapia doble consta del uso de un antibiótico y un inhibidor de la bomba de protones, siendo un régimen barato pero con 60-80% de efectividad(3). Existe una terapia triple sin sales de bismuto que tiene la misma efectividad que la anterior, solo que usando omeprazol en vez de sal de bismuto, la cual se usa por menos tiempo pero es mucho mas cara(2,3). En ésta se incluye 2 antibióticos y un inhibidor de la bomba de protones además de que solo se usa por 1 semana. En el caso de pacientes que no se curan, a pesar de triple terapia dos veces consecutivas se recomienda el uso de terapia cuádruple(11). Que consta de una sal de bismuto, metronidazol, tetraciclina y un inhibidor de la secreción ácida. Con dicho régimen se han reportado que en 100% de los casos hay erradicación total de la bacteria y solo se usa por 7 días(2). En años recientes se ha hecho un esfuerzo para la producción de vacunas contra *H. Pylori* y se han tenido buenos resultados con una administración oral de subunidades recombinantes purificados de *H. Pylori* (19). Además se ha usado la proteína de la ureasa con un coadyuvante de la mucosa conocido como LT, que ha tenido muy buenos resultados(19).

A través de estos estudios se ha demostrado que no solo es posible proteger a los no infectados de ser infectados, si no también es posible aclarar las bacterias en pacientes ya infectados(19).

En septiembre del año 1998 se presentó en el congreso internacional de terapia antimicrobiana, en San Diego, California, una investigación efectuada en Holanda, que demostró que el ajo tiene propiedades antimicrobianas contra *H. Pylori* usando un extracto de ajo acuoso que se le introdujo a un cultivo de *Helicobacter Pylori* y se pudo erradicar, determinándose una CIM de 5mg/ ml. (31,36)

B. AJO:

1. Definición:

El ajo es una planta que pertenece a la familia de las liliáceas, considerada pariente cercana de otras plantas como la cebolla. Su nombre científico es *Allium Sativum* (34,35), siendo una planta que consta de una raíz corta, posee un bulbo de forma esférica compuesta por gajos o dientes, tiene un tallo cilíndrico que llega a crecer hasta 50 cm, con hojas escasas de forma alargadas y planas y flores de color lila distribuidas en forma de ramillete(4). Esta planta se ha usado por sus propiedades medicinales durante miles de años por todas partes del mundo (21). En Guatemala los lugares donde más se cultiva es en Sololá y Huehuetenango(4).

2. Historia:

El ajo se ha utilizado por miles de años en muchas diferentes culturas, debido a sus propiedades medicinales, entre las cuales están los Griegos, los Romanos, Egipcios, Hebreos, Babilonios, Chinos e Hindúes. Se utilizó por los primeros atletas olímpicos para dar más fuerza. Pasteur descubrió su actividad antibacteriana en el año 1858, y Albert Schweitzer lo utilizó para tratar disentería amibiana(34). En Francia durante la epidemia de tifus en 1721, se le dió la tarea mortal de enterar a los muertos por esa epidemia a 4 cuatro prisioneros, quienes no adquirieron esta grave enfermedad porque tomaban una poción hecha de vino y ajo que les sirvió como profilaxis; esta poción en la actualidad se sigue produciendo en Francia y vendida por sus propiedades curativas, se le conoce como la vinagre de los cuatro ladrones (1). En la actualidad se han hecho gran cantidad de estudios con el ajo por todas partes del mundo siendo, todavía una planta medicinal respetada aun por la comunidad científica.

3. Usos medicinales atribuidos:

Al ajo se le han atribuido diferentes cualidades medicinales, entre las cuales podemos mencionar:

Antibacteriano: En experimentos hechos desde el tiempo de Pasteur se ha encontrado que el ajo tiene actividad antibacteriana contra las bacterias más difíciles de erradicar, incluyendo E. Coli, Pseudomona, y Estafilococo. (1,4,34,26).

Antimicótico: En algunos estudios se demostró que el ajo tenía mejor actividad antibiótica contra *Candida albicans* que la violeta de genciana y la nistatina. Entre otros hongos que son destruidos o inhibidos por el ajo, se pueden mencionar *Aspergillus*, *Paracoccidio*, y hasta *Cryptococo*. Se piensa que el agente químico responsable de esta acción es la alicina. (29,35).

Antiparasitario: En estudios efectuados en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, y Ciencias Médicas de la Universidad San Carlos de Guatemala, hace algunos años, se demostró que el ajo tenía actividad contra *áscaris lumbricoides*(33), así como contra amebas y tricomonas (29).

Antiviral: Se ha demostrado actividad contra citomegalovirus, además actividad in vitro contra influenza B, y también contra herpes simple tipo I.(4,29).

Anticanceroso: Se piensa que el ajo tiene tres formas de combatir ciertas enfermedades neoplásicas; en primer lugar tiene un efecto directo sobre los tumores, en segundo lugar actúa como un antioxidante que contrarresta la formación de compuestos N-nitrogenados y por último se han hecho experimentos en los cuales se le inyecta ajo a ciertos tumores y conforme pasa el tiempo estos presentan mayor cantidad de infiltración por células inmunitarias como linfocitos B y asesinos naturales, en lo cual se puede inferir que aumenta la inmunidad del enfermo(15). En el departamento de epidemiología de la Universidad del Norte de Carolina EE.UU. se encontró que las personas que consumían por lo menos 18g de ajo a la semana tenían 50% menos probabilidad de padecer cáncer gástrico y 30% menor probabilidad de padecer de cáncer

de colon; estudio que involucró 100,000 personas y tomo en cuenta 17 investigaciones realizadas en diferentes partes de los Estados Unidos (1,29,35).

Hipolipemiente: En algunos estudios se ha demostrado que el consumo de 5g de ajo al día reduce los niveles de lípidos en sangre, y a 10g por día reduce los niveles de colesterol(29). Además, en un estudio efectuado en la universidad de Pennsylvania, se demostró que tres componentes del ajo disminuyeron la producción de colesterol en el hígado de ratas hasta un 60%, siendo estos componentes: S-allylcisteina, S-metilcisteina y S-propilcisteina.(35). A pesar de lo antes expuesto, últimamente se han hecho estudios en la Universidad de Oxford y en Bonn Alemania, que contradice la teoría de que el ajo disminuye los niveles de colesterol y hasta se ha dicho que estos últimos dos estudios son los únicos que fueron adecuadamente diseñados, de tipo aleatorio, doble ciego y controlado(25).

Hipoglicemiante: Se han hecho experimentos con conejos que demuestran que estos mismos experimentan una hipoglucemia dependiente de dosis como respuesta al extracto de ajo, además se ha observado mejor tolerancia a la glucosa (29).

Anticoagulante: Se hizo un experimento con perros quienes se les había puesto aparatos de circulación extracorpórea los cuales tuvieron menor grado de trombocitopenia que los no expuestos a algunos componentes del ajo. Recientemente se otorgó una patente a un científico quien inventó un plástico con componentes del ajo conocidos como dithiinas; este plástico se puede insertar en el sistema circulatorio sin producir coágulos, lo cual nos da una alternativa al uso de implantes de válvula (35).

Mucolítico: Uno de los componentes importantes del ajo es la alliina, la cual difiere minimamente de otra droga conocida como carboximetilcisteina que se receta con frecuencia para tratar enfermedades respiratorias para mejor movilización del moco en los bronquios (29).

Hipotensor: En Europa se hizo un estudio con pacientes hipertensos a los cuales se les administro polvo de ajo y presentaron una disminución en supresión arterial de 10% en el curso de unas semanas, se cree que esto

se debió a que el ajo hacía liberar al cuerpo prostaglandinas (1). Además en otro artículo de la revista Planta Médica refieren que el ajo tiene un componente conocido como gamaglutamilcisteina la cual es un inhibidor de la ECA natural (2).

4. Composición química:

En el ajo se han aislado un sin número de sustancias a las cuales se le han encontrado muchas virtudes. Entre dichas sustancias se pueden mencionar: aliina, compuestos derivados del amino ácido cisteina, compuestos sulfurados (como la alicina), mucílago, esteroides, cobre, germanio, magnesio, selenio, vitaminas A, B1, y C. (4). Aunque contiene vitaminas la concentración de estas no es suficiente para llegar a la cantidad mínima recomendada para cada día, según la administración de drogas y alimentos de EEUU.(35)

Los compuestos del ajo que son azufrados y que le dan al ajo sus virtudes, se pueden categorizar de varias formas, entre las que están los compuestos con una vida media corta que sólo existen por una fracción de segundo después de macerar o cortar un diente de ajo; otros compuestos más estables pero aun difíciles de estudiar por su vida media corta, son las sustancias como la alicina formada después de que la aliina entra en contacto con una enzima conocida como aliinasa formándose la antes mencionada y unas 9 sustancias parecidas, que le dan el olor característico al ajo. Otras sustancias que se forman son las derivadas de las antes mencionadas cuando estas se les permite estar a temperatura ambiente por unas horas; entre las que se puede mencionar las ditiinas y ajoene. Por último existen las sustancias que se preparan del ajo después de destilarlas por arrastre de vapor conocidos como los dialil-sulfuros (24).

5. Farmacocinesis:

Según estudios realizados en la China donde se le ha administrado alicina radioactiva a ratones, se ha demostrado que en 30 minutos existe

mayor concentración de la sustancia en corazón y pulmones, y menor concentración en hígado, bazo y músculo (29).

6. Toxicidad:

Se han reportado daños gastrointestinales en las personas que ingieren grandes cantidades de ajo crudo (24), así como, en casos aislados cambios en la flora intestinal (35), en algunos casos también flebitis en pacientes a quienes se les ha inyectado IV (29). En la literatura occidental sólo se ha reportado un caso de reacción seria contra el ajo, siendo una hemorragia atribuida a la ingestión de grandes cantidades de ajo (29). La dosis letal media de alicina en ratones es de 60mg/Kg administrado IV y 120mg/Kg subcutáneo (4).

7. Contraindicaciones:

Según la OMS se contraindica el uso de ajo a las personas quienes son alérgicas al ajo, también se contraindica en pacientes prequirúrgicos dado al peligro de hemorragia (35).

8. Dosis recomendadas:

Se recomiendan 4g al día de ajo fresco macerado por vía oral(35), para obtener sus efectos profilácticos en la mayoría de cualidades atribuidas. Cáceres recomienda 2-4g tres veces al día para tratar enfermedades respiratorias(4). Para tener efecto anticanceroso se requieren por lo menos 18 gramos de ajo al día, encontrándose en cada diente de ajo por lo menos 3g (36).

C. SALES DE BISMUTO:

1. Definición:

El bismuto es un elemento puro que en la tabla de elementos se encuentra en el grupo V. Es considerado un metal pesado, con peso atómico de 208.9, número atómico de 83 y valencia de 3 (27). Las sales de Bismuto por sus diversas propiedades, son compuestos que se han utilizado desde hace 267 años, desde pomadas para la piel, hasta antidiarreico y antiácido(3). Existen varios tipos principales de compuestos de sales de bismuto que se utilizan hoy en día para el tratamiento de enfermedades por *H. Pylori*, entre los que están el subsalicilato de bismuto, el subcitrato de bismuto. Los compuestos de bismuto no tienen la capacidad de neutralizar el ácido gástrico, más bien se les atribuyen propiedades citoprotectoras entre estas se puede mencionar: el incremento de la secreción de moco y bicarbonato, inhibición de la actividad de pepsina, y la acumulación de subcitrato de bismuto en el cráter de las úlceras formando una capa protectora, sumado a su actividad antibacteriana contra *H. Pylori* (8,13). En ninguna literatura revisada se pudo encontrar exactamente cual es el mecanismo de acción por el cual las sales de bismuto atacan a la bacteria, sospechándose que todavía no se sabe su mecanismo de acción. Después de ser ingerido el subcitrato de bismuto reacciona con el ácido gástrico para formar un compuesto de bismuto iónico el cual tienen afinidad por la mucosa gástrica manteniéndose ahí por tres horas en concentraciones de inhibición mínima para *H. Pylori* (≥ 25 mg de bismuto)(27). Este compuesto se absorbe y más de un 90% se recupera en orina. El bismuto plasmático tiene una vida media de 5 días y se excreta por bilis, saliva, y orina(8). Entre los efectos adversos y tóxicos del uso de sales de bismuto se ha mencionado la coloración negra de mucosa oral y las heces por una reacción química que ocurre entre las sales de bismuto y el H₂S bacteriano (8); además se han mencionado encefalopatías, pero más con el subsalicilato de bismuto que con el subcitrato (13), aunque es necesario la ingestión crónica de dosis mayores a las recomendadas para presentar toxicidad, no asociándose la ingestión oral de sales de bismuto con cuadros agudos de toxicidad (27).

VI. HIPÓTESIS

Ho: Al asociar ajo a sales de bismuto no se observa sinergia en su actividad antibacteriana sobre H. Pylori *in vitro*.

HA: Al asociar ajo a sales de bismuto se observara sinergia en su actividad antibacteriana sobre H. Pylori *in vitro*.

VII. MATERIAL Y METODOS

A. METODOLOGÍA:

1. Tipo de estudio: Experimental

2. Sujeto de estudio: H. Pylori

3. Muestra de estudio:

La muestra de estudio fue 5 diferentes cepas de H. Pylori provenientes del cepario del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP). Se tomaron 5 muestras de H. Pylori principalmente para aumentar las probabilidades de su cultivo. Por ser este estudio un ensayo experimental no se considero necesario tomar una muestra representativa.

4. Criterios de inclusión y exclusión:

Se tomaron 5 cepas de H. Pylori del cepario del INCAP provenientes de pacientes que no habían tenido algún tipo de tratamiento anti H. Pylori, ni antiseptor durante por lo menos una semana antes de la toma de muestra.

Las cepas obtenidas del INCAP, fueron incluidas, al haberse cultivado e identificado adecuadamente.

5. Variables de estudio:

Variable	Def. Concepto.	Def. operativa	Tipo de variable	Unidad medida	Instrumento
Sinergia. Dependiente	Cuando al combinar 2 antibióticos su acción antibacteriana ocurre a $< o =$ a 25% de la C.I.M de cada fármaco por separado	Que al combinar ajo + bismuto se requerirá menor cantidad de ambos para matar la bacteria un 25% o menos	Nominal	Sin crecimiento o con crecimiento	Cultivo en caja de petri
Ajo. Independiente	Planta liliáceas que hecha en la raíz un bulbo blanco y carnosos, usado como condimento.	Bulbo cuyas propiedades antibacterianas se verificaran ante H.Pylori.	razón	Ml de ajo / ml de caldo de cultivo	Tubos de ensayo
H. Pylori. Dependiente	Bacteria Gram negativa en forma espiral flagelada causante de enfermedad gastrointestinal.	Bacteria gram negativa causante de enfermedad gastrointestinal.	Nominal	Crecimiento de H.Pylori	Cultivo en caja de petri

Sales de bismuto. Independiente	Sustancias en forma cristaloides polvos finos de diferentes colores cuando se encuentran en solución se usan para tratar enfermedades medicas y veterinarias	Compuesto químico utilizado para aliviar enfermedades gastrointestinales.	Razón	Mg/ ml	Tubos de ensayo
Antibacteriano. Dependiente	Sustancia que inhibe el crecimiento bacteriano destruye al microorganismo.	Propiedad de poder inhibir el crecimiento bacteriano en caja de petri.	Nominal	Crecimiento o no crecimiento de H.Pylori	Boleta

6. Procedimiento:

a. Para la obtención y preparación de sustancias utilizadas

i. Extracto de ajo

Para la preparación del ajo se decidió usar un extracto de ajo acuoso principalmente por ser este más soluble en el medio acuoso de los caldos de cultivo. Se preparo utilizando la siguiente técnica: primero se licuó 100g de ajo, posteriormente se filtro el ajo a través de una gaza para extraer así el aceite esencial, mismo que se centrífugo por 45 minutos a 2500 revoluciones por minuto y esterilizándose con un filtro especial con el objeto de esterilizar sustancias termolábiles (conocido como millipore), el extracto de ajo que resultó fue sustancia acuosa que se guardó a -70 grados Celsius para ser utilizado posteriormente.

ii. Subsalicilato de bismuto.

El subsalicilato de bismuto en forma pura y deshidratada gracias a una donación de los laboratorios Donovan – Werke.

b. Para el manejo de las cepas de H. Pylori.

Primero se obtuvieron cepas de H.Pylori que provenientes de 5 diferentes pacientes, quienes hayan sido sometidos a procedimientos de gastroscopía en el IGSS. Es importante mencionar que a los pacientes a quienes se les tomó la muestra para cultivo no hubiesen tenido ningún tipo de tratamiento previo con cualquier antibiótico, ni terapia antisecretora, por lo menos una semana antes de la toma de la muestra.

Dichas cepas ya cultivadas e identificadas provenientes del cepario del INCAP, se insertaron en un medio de transporte de tipo caldo triptosa fosfato mas glicerol al 20% a $+4^{\circ}\text{C}$ grados, para posteriormente cultivarse en el laboratorio multidisciplinario de la Facultad de ciencias medicas Universidad San Carlos de Guatemala, utilizándose para el efecto un medio de cultivo no selectivo conocido como Agar sangre de Carnero. El período de incubación tardó de 7 a 15 días, durante los cuales se debió precisar ciertas condiciones como: una temperatura entre 35 a 37 grados Celsius, un entorno gaseoso con 5 a 10% de O_2 , 5-10% de CO_2 , 5 a 8% H_2 y 80-90% de N_2 a presión de 200 mmHg y un pH entre 4 y 7. Después de 7 a 15 días se observó el crecimiento bacteriano de una sola cepa de las 5

cultivadas, lo cual se dio después de múltiples intentos, mostrando dicha cepa las siguientes características: colonias carentes de color (translucidas), de 1-2mm.

Posterior a lograr su cultivo se hizo un análisis bioquímico de las mismas para determinar si tenía las características enzimáticas de *H. Pylori*, detectando que sí poseía actividad de las enzimas catalasa, oxidasa, ureasa. Después de haber identificado la bacteria, a través de su perfil bioquímico, se procedió a insertar varias hasadas del cultivo a un caldo de cultivo de triptosa fosfato hasta obtener una solución estándar de Mcfarland de 0.5

c. para el estudio in vitro

Con la concentración de bacterias arriba indicada se introdujo una hasada milimetrada de solución Mcfarland, aproximadamente unas 500,000 unidades formadoras de colonia a 12 viales (ver anexo 1) de medio de cultivo líquido constando de brain heart infusion (BHI) + extracto de levadura al 3% + suero fetal bovino al 5%.

En los primeros cuatro viales se agregó, además de lo anterior, un extracto de ajo acuoso esterilizado con un filtro millipore de tamaño 45 micras; en el primer tubo se introdujo una concentración de 0.5ml de extracto de ajo en cada ml de caldo (5mg/ml), en el segundo vial se introdujo 75% de la concentración anterior, en el tercer vial se introdujo 50% y en el cuarto 25%.

En los siguientes cuatro viales se introdujo en vez de ajo cuatro diferentes concentraciones de subsalicilato de bismuto, en el primero se introdujo 25mg/ml, en el segundo se introdujo el 75% del primer vial en el tercero el 50% y en el cuarto el 25%.

Finalmente en los últimos cuatro viales se introdujo subsalicilato de bismuto mas extracto de ajo, (el bismuto a concentración de 6.25mg/ml y el ajo a .125ml/ml) en el primer vial, en el segundo 75%, en el tercero 50% y el cuarto 25%.

Luego se guardaron los caldos de cultivo en condiciones adecuadas para el crecimiento de H. Pylori por 7 días, al final de esos 7 días se sembró lo que había crecido en cada vial en un plato de petri con agar sangre de carnero y se espero 7 días para ver y analizar resultados.

Los criterios utilizados para determinar si las sustancias tenían actividad antibacteriana contra H. Pylori fueron los mismos utilizados durante un estudio de concentración bactericida mínima en el cual se observa si existió crecimiento en una caja de petri después de ser expuesta la bacteria a una determinada concentración de sustancia antibiótica.

VIII. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

TABLA #1

Actividad antimicrobiana del ajo (extracto) sobre el Helicobacter Pylori, según concentración del mismo.
Laboratorio Multidisciplinario Facultad de Ciencias Medicas
Universidad San Carlos de Guatemala durante los meses de Junio a Septiembre del 2000

Concent. De extracto de ajo acuoso	0.5ml/ml	0.375ml/ml	0.25ml/ml	0.125ml/ml
Crecimiento de H. Pylori	NO	SI	SI	SI

Fuente: Laboratorio Multidisciplinario, Facultad de Ciencias Medicas, Universidad San Carlos de Guatemala

TABLA #2

Actividad antimicrobiana del subsalicilato de bismuto sobre
 Helicobacter Pylori, según concentración del mismo.
 Laboratorio Multidisciplinario, Facultad de ciencias Medicas
 Universidad San Carlos de Guatemala
 Durante los meses de Junio a Septiembre del 2000

concentración subsalicilato de Bi	25mg/ml	18.75mg/ml	12.5mg/ml	6.25mg/ml
Crecimiento de H. Pylori	NO	SI	SI	SI

Fuente: Laboratorio Multidisciplinario, Facultad de Ciencias Medicas,
 USAC

TABLA #3

Actividad antimicrobiana del ajo y subsalicilato de bismuto sobre Helicobacter Pylori, al 25% de CIM y menos para la determinación de sinergismo. Laboratorio Multidisciplinario Facultad de Ciencias Medicas Universidad San Carlos de Guatemala durante los meses de Junio a Septiembre 2000.

concentración de ajo + Bismuto	AJO 0.125ml/ ml Bi 6.25mg/ ml	AJO 0.093ml/ml Bi 4.68mg/ml	AJO 0.06 ml/ml Bi 3.12mg/ml	AJO 0.031ml/ml Bi 1.56mg/ml
Crecimiento de H. pylori	NO	SI	SI	SI

Fuente: Laboratorio Multidisciplinario, Facultad de Ciencias Medicas USAC

*Por cada 9 mg(+o -3 dientes) de ajo se extrae un ml de jugo.

IX. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De acuerdo a los datos presentados en la tabla #1, se pudo observar, tal y como se especifico en el marco teórico, la concentración inhibitoria mínima de ajo que detuvo el crecimiento de H. Pylori en el presente estudio, fue de 5mg de ajo por ml de liquido dilutor o 0.5ml de extracto de ajo acuoso por ml de solución, al exponer a la bacteria a concentraciones menores se vio que si hubo crecimiento de Helicobacter Pylori esto ocurrió principalmente por el hecho de que la cantidad de ajo necesaria para matar a la bacteria no era la suficiente en los viales que contenían una concentración menor que la antes mencionada. Estos resultados concuerdan con estudios hechos anteriormente en otros países.

En la tabla #2 se puede observar que la concentración inhibitoria mínima de subsalicilato de bismuto necesaria para inhibir el crecimiento de Helicobacter Pylori es el mismo que se había especificado en el marco teórico el cual es de 25mg por ml, a menores concentraciones hubo crecimiento; por lo tanto 25mg por ml es la concentración mínima de subsalicilato de bismuto necesaria para impedir el crecimiento y proliferación de la bacteria.

En la tabla número 3 se demuestra que si existe sinergismo al unir ajo mas subsalicilato de bismuto a una concentración de un 25% de ambos compuestos, esto significa que uniendo estos dos compuestos aumenta la probabilidad de erradicar al Helicobacter Pylori. Por lo tanto se descarta la hipótesis nula planteada anteriormente y se acepta la hipótesis alterna.

Comparando la actividad antibacteriana que tuvo el extracto de ajo y las sales de bismuto se pudo observar que la cantidad necesaria de ajo para inhibir el crecimiento bacteriano fueron menores que las de subsalicilato de bismuto, esto es de suma importancia principalmente por el hecho de que entre menos cantidad de una sustancia se requiere para erradicar una bacteria menos riesgo de toxicidad para el paciente, otro aspecto que se observo fue el hecho de que la solubilidad del extracto de ajo presento una mejor solubilidad en un ambiente acuoso que el subsalicilato de bismuto, esto también pudo haber influido en la menor cantidad de ajo que fueron necesarias para poder inhibir el crecimiento de Helicobacter Pylori. Con este ultimo análisis se cumple el

objetivo número 2 en el cual se plantea hacer una comparación entre la actividad antibacteriana del ajo y bismuto sobre H. Pylori

Los resultados del presente estudio tienen una gran trascendencia principalmente por el mismo hecho de que se sientan las bases para poder iniciar futuros estudios con animales y posteriormente con humanos y así llegar a la meta final la cual es proponer una terapia alternativa de buena efectividad y de costos menores que las actuales terapias.

X. CONCLUSIONES

- 1) El ajo sí tiene actividad antibacteriana contra *Helicobacter Pylori* *in vitro*.
- 2) Se requiere menor cantidad de ajo que subsalicilato de bismuto para inhibir el crecimiento bacteriano de *Helicobacter Pylori* *in vitro*.
- 3) Sí existe sinergismo entre el subsalicilato de bismuto y el extracto de ajo acuoso sobre *Helicobacter Pylori* *in vitro*.

XI. RECOMENDACIONES

- 1) Se dé continuidad a este estudio, primeramente en pacientes animales y posteriormente en pacientes humanos para tener una alternativa en cuanto a tratamiento de Helicobacter Pylori.

- 2) Que se hagan estudios de Biodisponibilidad y farmacocinética del ajo en el cuerpo humano.

- 3) Continuar los estudios de medicina alternativa en la Facultad de Ciencias Medicas de la Universidad San Carlos de Guatemala

- 4) Fomentar las investigaciones de tipo experimental en la Facultad de Ciencias Medicas de la Universidad San Carlos de Guatemala.

XII. RESUMEN

El presente trabajo de investigación realizado en el laboratorio multidisciplinario de la facultad de Ciencias Medicas de la Universidad San Carlos de Guatemala de Febrero a Septiembre del año 2000; se

orientó determinar la actividad antibacteriana que tiene el ajo sobre *Helicobacter Pylori in vitro*, así como si este mismo muestra sinergismo al ser combinado con subsalicilato de bismuto *in vitro*.

Para el efecto se obtuvieron 5 cepas de *H. Pylori* del cepario del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), estas mismas se cultivaron en medio no selectivo por 7 días en condiciones microaerofilicas, luego se sembraron en caldo de cultivo no selectivo por 7 días en condiciones microaerofilicas con la variante de que cada vial de caldo de cultivo contenía una concentración determinada de ajo, bismuto o ambas sustancias, posteriormente esta sepa se sembró una tercera vez para observar si existió crecimiento o no a cada una de las concentraciones especificadas.

Los resultados evidenciaron que si existe actividad antibacteriana del ajo sobre *Helicobacter pylori in vitro* a concentración de 0.5ml de extracto por ml de solución además se demostró que juntos el ajo y el subsalicilato de bismuto presentan la cualidad de sinergismo *in vitro* a concentración de 25% de la CIM .

Se recomienda a los investigadores interesados en seguir con esta línea de investigación y continuar estos estudios *in vivo*, primero con animales y posteriormente con humanos, para así poder recomendar una terapia alternativa y más barata para enfermedad péptica causada por *Helicobacter pylori*. Así mismo el fomento de estudios de medicina alternativa y de los estudios de tipo experimental en la Facultad de Ciencias Medicas de la USAC.

XIII. BIBLIOGRAFIA

1. Albrecht Frances. The healing Power of Garlic
http://www.delicious-online.com/D_backs/July_96/toc.html

2. Algarra Guijarro Felipe, Helicobacter Pylori. Revisión Actualizada
http://216.33.236.250/cgi-bin/linkrd?_lang=&lah=7f9ef64217dd628107524c1b903c45d6&lat=952367502&hm__action=anuncios%2ehtm

3. Bonagura Anthony F. Dabezies Marta A. "Helicobacter Pylori, Infection, the Importance of Eradication in patients with Gastric Disease"
http://www.postgradmed.com/issues/1996/11_96/bonagura.htm

4. Cáceres A. Plantas de uso medicinales en Guatemala. 1ed. Editorial universitaria Guatemala 1996.

5. Challem Jack. The Wanders of Garlic
www.thenutritionreporter.com/garlic.html

6. Dubois Andre, Spiral Bacteria in the human stomach: The Gastric Helicobacters. www.cdc.gov/ncidod/EID/vol1no3/dubois.htm

7. Ferrandiz Santos Juan, Amador Romero Javier, Helicobacter Pylori sesiones clínicas
<http://www.capsemfyc.com/Sesclin/SC0012/SC0012.htm>

8. Goodman, Gilman. Bases farmacológicas de la terapéutica 9ed. McGraw –Hill México 1996.

9. Harry L. T. Defining Helicobacter Pylori a Pathogen: Strain Heterogeneity and Virulence. The American Journal of Medicine 1996; 100 (20): 5º-115.

10. Heilman KL, Bourchard F. Gastritis due to spiral shaped bacteria other than Helicobacter pylori: clinical, histological and ultrastructural findings. Gut. 1991; vol 32; Pg.137-140.

11. Hunt R. et al. Canadian Helicobacter consensus conference.
Canadian Journal of Gastroenterology 1998;12(1):31-41.
12. Katos; et al. Long-term follow up study of serum imunoglobulin G and A antibodies after Helicobacter pylori eradication. Pediatrics; 1999; Aug vol 104; Pg 22
13. Katzung B. MD. PHD. Farmacología básica y clínica 2da Ed. Editorial Manual Moderno Mexico1999. 1200pg.
14. Lain L. Estrada R. Trujillo M. Therapy May Skew Helicobacter pylori Testing
<httpsting://oncology.medscape.com/CPG/ClinReviews/1999/v09.n01/c0901.lit/c0901.lit3.html>
15. Lau Benjamin MD. Garlic and Your Health
http://www.naturalland.com/hlgv/hh/hh.htm
16. Lee Adrian; “To intervene or not to intervene? That is the question
Mucosal Immunology Update: Dec. 97 vol. 5, Pg. 70-74
17. McNulty C, Dent JC, et al. New spiral bacterium in gastric mucosa.
Journal of clinical pathology 1989; vol 42; Pg, 585-591
18. Miller Karl, MD. Seven day triple combination therapy for helicobacter Pylori. American Family Physician; 1998 vol.57 issue 8, Pg.1981
19. Monath. T, Thomas P; et al. The search for vaccines against H. Pylori Infect. Med. 1998;15(8): Pg534-536

20. Moreira Diaz, Juan Pablo. Prevalencia de Helicobacter Pylori en pacientes con enfermedad péptica en el área rural. Tesis (Médico y Cirujano) Universidad San Carlos de Guatemala Facultad de Ciencias Medicas,, 1998, 38p.
21. Nando E. A Garlic Chemistry Primer
<http://www4.nando.net/nt/health/>
22. NIH concensus conference . Helicobacter in peptic ulcer diosis.
JAMA 1994; vol272: Pg.65-69
23. Parsonet j, Freedman GD, Vandersteen DP, et al. Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. New England Journal of Medicine 1991; 325: 1127-31
24. Passwater Richard A. MD. The chemistry of garlic Health Benefits:
www.solgar.com/nutrition_library/healthy_living/garlic.html
25. Rodríguez Alejandra. El Ajo y sus Falsas Virtudes
http://216.33.236.250/cgi-bin/linkrd?_lang=&lah=ed73cb70873385b7c6bd4f50a9f39e35&lat=950899676&hm___action=%2fsalud%2f299%2f
26. Ruiz Urizar A. Efectos de algunas sustancias y preparaciones vegetales sobre bacterias causales de conjuntivitis. Tesis (Químico Farmacéutico), Universidad San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéutica, 1981 34pp.
27. Shneider et al. Eficacia del subcitrato de Bi y subsalicilato de Bi para la erradicación de la infección de H.Pylori presente en adultos afiliados al IGSS. Medicina Interna; volumen 4 No. 2 Dic 1993.

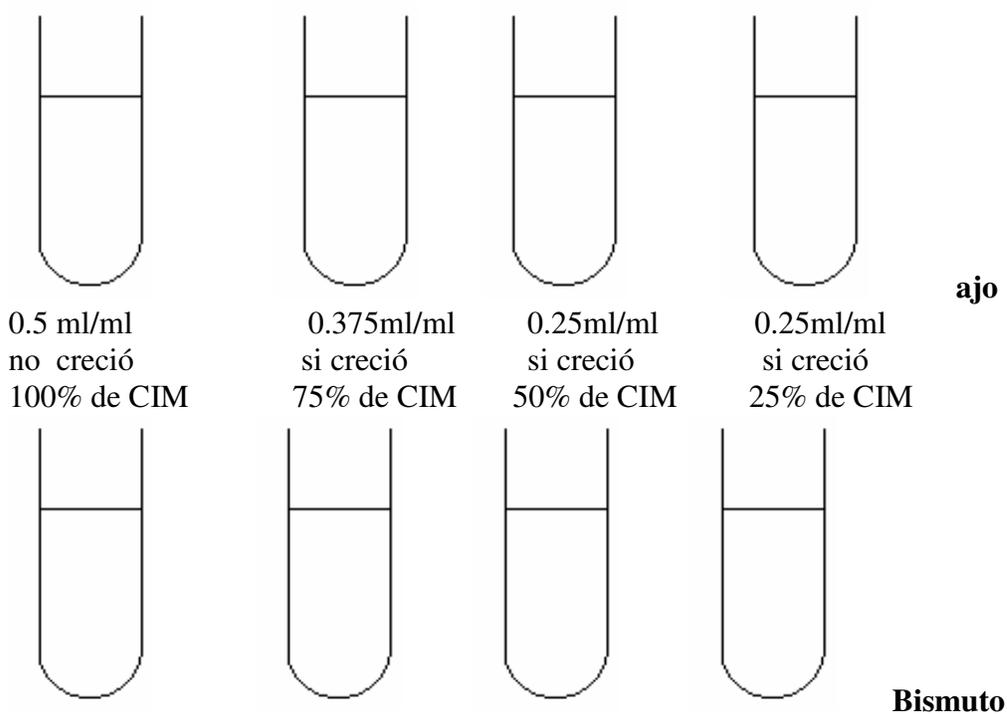
28. Slack F. Infectious Disease News: Pharmacotherapy of Helicobacter Pylori Part 1; www.slackinc.com/general/idn/199602/consult.htm
29. Subhuti Dharmananda; Institute for Traditional Medicine Garlic as the Central Herb Therapy for AIDS: www.rdi.gpo.or.th/NetZine/V3N42/garlic.htm
30. The Helicobacter H.Pylori foundation www.helico.com
31. The Nutrition reporter. Garlic fights ulcers www.aboutliving.com/02231999/infobytes...ghtsUlcershtml
32. Toledo Cumes, Jair, A. Prevalencia de Helicobacter H.Pylori en pacientes con enfermedad péptica en el hospital Roosevelt. Tesis (Medico y Cirujano), Universidad San Carlos de Guatemala Facultad de Ciencias Medicas, 1997, 36p
33. Vergara Caballeros M. Separación de la fracción , que contiene al principio activo contra áscaris lumbricoides a partir del bulbode ajo Tesis (Químico Farmacéutico), Universidad San Carlos de Guatemala Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéutica 1982. 50csp.
34. Viable Herbal Solutions. http://216.33.236.250/cgi-bin/linkrd_lang=&dash=1a275e9fa76d0ecf45eb548fe48c94a&lat=950899756&hm_____action=1garlic%2ehtm%23Garlic

35. Wozniki Katrina. Allyum Sativum

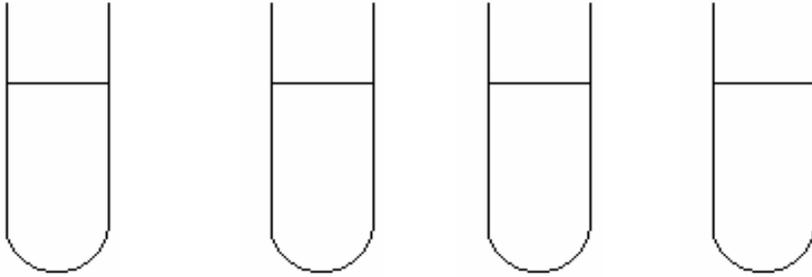
<http://onhealth.com/ch1/resource/herbs/item,16000.asp>

36. Woznicki Katrina. Garlic helps prevent ulcers

www1.onhealth.com/ch1/briefs/item%2C25393.asp



25mg/ml	18.75mg/ml	12.5mg/ml	6.25mg/ml
no creció	si creció	si creció	si creció
100% de CIM	75% de CIM	50% de CIM	25% de CIM



ajo: 0.125ml/ml	0.093ml/ml	0.06ml/ml	0.031ml/ml	ajo + bismuto
Bismuto: 6.25mg/ml	4.68mg/ml	3.12mg/ml	1.56mg/ml	
No creció	si creció	si creció	si creció	
25% de CIM	18.5% de CIM	12.4% deCIM	6.2% de CIM	

En los viales donde si hubo crecimiento es donde no fue suficiente la concentración de sustancias para inhibir el crecimiento bacteriano, en el vial donde se combinó ajo y bismuto se observó que con solo el 25% de CIM se inhibió el crecimiento mientras que cuando ambas sustancias se usaron por si solas a 25% de CIM si hubo crecimiento a este fenómeno se le define como sinergismo.

ANEXO # 1