



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

***“DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN (PASTA) DE SUBSALICILATO
DE BISMUTO PARA EL TRATAMIENTO DE DIARREA EN EQUINOS”***

TESIS

Que para optar por el grado de:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

LIZETH DESIREÉ CONTRERAS MONTOYA

TUTOR

DRA. RAQUEL LÓPEZ ARELLANO (FES-C, UNAM)

COMITÉ TUTORAL:

**DR. ROBERTO TORREZ DÍAZ (FES-C, UNAM)
DR. EFRÉN RAMÍREZ BRIBIESCA (COLEGIO DE POSTGRADUADOS)**

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, noviembre de 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*“Educar la mente sin educar el corazón,
no es educar en absoluto”.*

Aristóteles

Dedicatorías

A Dios

Padre, Tú eres MI ROCA. Gracias por todo.

A mis padres

Que me dieron lo mejor tuvieron y llenaron mi vida de bendiciones.

A Andrea, mi madre

Quien me ha apoyado en cada sueño, proyecto y locura de manera incondicional. Gracias por tu ejemplo de gentileza, bondad y buen corazón.

A Héctor, mi padre

Por sus enseñanzas de perseverancia, disciplina y fortaleza.

A Rení y Bere

Que aún en la distancia y el tiempo, me han abrazado y me han hecho fuerte. Rení: no pude tener mejor hermano que tú. Bere: eres mi hermana y punto.

A Doña Carmelita, Don Carlos, Doña Celia y Don Roberto

Que fueron el comienzo de mi historia. Donde quiera que se encuentren GRACIAS, por haberme hecho sentir amada y valorada en todo momento. Aún los extraño.

A los caballos maestros

Que en silencio, con sus grandes y hermosos ojos, me miran aprender cada día.

A Magia y Pinto

A quienes ví llegar y desde entonces prestan su ser a la enseñanza de quienes estamos ávidos y sedientos de su maravillosa especie.

A mis amigas y amigos

A las antiguas amistades que dejaron algo positivo en mí persona que me acompaña aún en estos días. A las nuevas amistades que vinieron a darle un nuevo aliento y cariño a mi vida.

Ainsi qu'à tous ceux qui m'ont motivée depuis l'autre coté de l'Atlantique.

A cada extraordinaria persona

Que he tenido la fortuna de cruzar en mi camino y que de manera desinteresada y honesta me tendió la mano.

GRACIAS.

Dios los bendiga siempre.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme permitido iniciarme en el dominio científico y haberme brindado, nuevamente, la oportunidad de crecer como profesionalista y ser humano.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán que vio nacer mi deseo de desarrollarme en el ámbito científico y continuar así mi formación profesional proveyéndome de herramientas y personal académico de excelencia para llevar a cabo este proyecto de investigación en beneficio de los equinos, mi fuente permanente de inspiración.

A mis Padres y mi hermano, que en conjunto y de manera personal lograron cultivar de una u otra manera, lo mejor de mí. Los amo.

A la Dra. Raquel López Arellano, por aceptarme en su equipo de trabajo en LEDEFAR y confiar en este proyecto brindándome su apoyo y entusiasmo característicos. Gracias por la paciencia.

A mi Comité Tutoral que aportó y ayudó ávidamente en la guía de este trabajo: el Dr. Roberto Torres Díaz y el Dr. Efrén Ramírez Bribiesca.

Al Comité revisor de mi trabajo de tesis: el Dr. Roberto Torrez Días y al Dr. Efrén Ramírez Bribiesca, por su guía, ayuda y apoyo reiterados. Al M. en E. Esp. Cert. Felipe de Jesús Cortés Delgadillo y a la Dra. María Masri Daba, por su tiempo y aportaciones al presente trabajo.

Al apoyo por parte del proyecto PAPIIT clave IN 218115, gracias al cual se llevó a cabo el presente trabajo de investigación.

A la compañía Ashland y a la QFB María Alejandra Álvarez por la donación de Rapithix para la realización de este trabajo científico.

A la importadora y manufacturera Bruluart y al QFB Oscar Alberto Nolasco Luna por la donación del PEG 400 para la realización de este trabajo científico.

A la Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez y a su equipo de trabajo por su apoyo en el análisis del bismuto.

Al Dr. Juan Carlos del Río García por apoyar este trabajo de investigación y ayudar siempre en la búsqueda de soluciones para la realización del mismo, sobre todo en momentos de dificultad; al Laboratorio 14 de la UIM y a sus investigadores, quienes me brindaron su ayuda de manera amable y precisa.

Al M.V.Z. Marco Antonio Mendoza Saavedra, por su invaluable tiempo, apoyo y paciencia reiterados, así como al equipo de académicos del laboratorio de Diagnóstico Bacteriológico y Micológico Veterinarios de la FES-Cuautitlán por su

apoyo en realización de las pruebas bacteriológicas para este trabajo científico; a la profesora Marichelo Álvarez Rodríguez por su tiempo y presteza para las mismas.

Al M.V.Z. M. en E. Felipe de Jesús Cortés Delgadillo y a la M.V.Z. Cecilia Barragán Segura por su apoyo en el inicio y término de este proyecto personal y profesional.

Al M.V.Z. Eugenio Bravo Quintanar por ser un maestro en toda la extensión de la palabra, a nivel profesional y personal y por brindarme sus sabios consejos en esta travesía.

Al Hospital de Equinos por permitirme usar los equinos disponibles para las pruebas necesarias en este trabajo científico y usar sus instalaciones de manera permanente.

A la Unidad de Policía Metropolitana Montada de la Secretaría de Seguridad Pública del Distrito Federal, a su Director el Mayor Antonio Alfaro Ramos y al M.V.Z. Cert. Manuel Eduardo Morones Soto, Responsable de la Unidad Médico Veterinaria, por permitirme experimentar con los equinos que albergan en su institución y agradezco a los médicos veterinarios que laboran en la misma por su apoyo brindado en cada ocasión.

Al M.C. José Alfredo Cuellar y a la Dra. Suemi Rodríguez Romo por su apoyo para que una servidora pudiera llevar a cabo este trabajo de investigación y permitirme seguir creciendo profesionalmente.

Al pFarmacia Andrés Monterrozas por compartir su conocimiento y aceptar el mío y así realizar este trabajo en beneficio de los equinos.

Al equipo de LEDEFAR por la enseñanza, paciencia, apoyo y motivación que me brindaron siempre. Agradezco al M.C. Hugo Cuatecontzi, a la M.C. Gabriela Rodríguez y al M.C. Víctor Díaz por su apoyo reiterado.

GRACIAS

Resumen

El sistema digestivo de los equinos es propenso a presentar desequilibrios y posibles patologías, por tal motivo se han instaurado diversos tratamientos médicos y quirúrgicos para la resolución de los mismos. Una de las complicaciones más comunes en el tubo digestivo, independientemente de la etiología, es la presentación de diarreas. Actualmente se busca innovar desarrollos de las formas farmacéuticas de fácil utilización para el médico veterinario que le permitan instaurar un tratamiento eficaz y práctico. El objetivo del trabajo fue desarrollar una forma farmacéutica de pasta, a base de Subsalicilato de Bismuto, adyuvante en el tratamiento de diarreas, indistintamente de la etiología. Se planteó el desarrollo de una pasta de administración oral a una dosis inicial de 9 g de Subsalicilato de Bismuto para un caballo adulto de 450 kg (20 mg/kg) la cual se administró a los equinos disponibles en el Hospital de Equinos de la FES-Cuautitlán, UNAM. Se realizó un diseño de experimentos de Plackett-Burman modificado. Posteriormente se llevó a cabo el estudio de estabilidad física entre el principio activo y los excipientes empleados para el desarrollo de la formulación, así como la evaluación de la densidad y velocidad de flujo seguidamente de las pruebas para la determinación de salicilatos y bismuto. Una vez realizados dichos análisis se seleccionó una de las diez formulaciones iniciales y se administró a los equinos disponibles realizando posteriormente pruebas microbiológicas exploratorias en heces para *Salmonella*, coliformes y mesófilos.

Palabras clave: Subsalicilato de Bismuto, pasta, formulación, diarrea, equino.

Abstract

The equine digestive system is one of the most likely to present imbalances and possible pathologies, for this reason several medical and surgical treatments have been set up for their resolution. One of the most common complications within the digestive tube, regardless the etiology, is the presentation of diarrheas. At present, the development of the easy-to-use pharmaceutical forms for the veterinarian is being sought to enable effective and practical treatment. The objective of this work was to develop a paste pharmaceutical form, based on Bismuth Subsalsicylate, adjuvant in the treatment of diarrhea, regardless the etiology. It was developed an oral administration paste at an initial dose of 9 g of Bismuth Subsalsicylate for an adult horse of 450 kg (20 mg / kg), which was administered to the equines available at the Equine Hospital of FES-Cuautitlán, UNAM. A Plackett-Burman modified experiment was performed. Subsequently, the study of physical stability between the active ingredient and the excipients used for the development of the formulation was carried out, as well as an evaluation of the density and flow rate followed by the tests for the determination of salicylates and bismuth. Once these analyzes were performed, it was selected one of the ten initial formulations which was given to the available horses and microbiological exploratory tests in feces were performed for *Salmonella*, coliforms and mesophiles.

Key words: Bismuth subsalsicylate, paste, formulation, diarrhea, equine.

ÍNDICE

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	II
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	IV
I INTRODUCCIÓN	1
II JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	3
A. Justificación.....	3
B. Hipótesis.....	3
III OBJETIVOS	4
A. Objetivo general.....	4
B. Objetivos particulares.....	4
IV MARCO TEÓRICO	5
1. Tracto gastrointestinal del equino.....	5
1.1. Anatomía.....	5
1.2. Los segmentos más caudales del tracto gastrointestinal.....	5
1.3. Intestino grueso del equino.....	8
1.4. Digestión de la fibra.....	8
2. Microbiología del tracto gastrointestinal del caballo.....	8
2.1. Población microbiana en el intestino grueso.....	11
3. Diarrea en el equino.....	12
3.1. Presentación clínica de la diarrea.....	13
3.2. Patofisiología de la diarrea aguda.....	14
3.3. Causas de diarrea	15
3.3.1. Causas no infecciosas de diarrea.....	16
3.3.1.1 Alteraciones en la dieta y sobrecarga de carbohidratos.....	16
3.3.1.2. Diarrea asociada a antimicrobianos.....	18
3.3.1.3. Anti-inflamatorios no esteroidales.....	21
3.3.2. Causas infecciosas de diarrea.....	23



Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

Índice

3.3.2.1. Salmonelosis.....	23
3.3.2.2. Enterocolitis clostridiana.....	27
3.3.2.3. Enteritis parasitarias.....	30
3.4. Diarrea en los potros.....	30
3.5. Consideraciones terapéuticas en casos de diarrea aguda.....	31
3.5.1. Reemplazar pérdida de fluidos y electrolitos.....	32
3.5.2. Controlar la inflamación sistémica.....	33
3.5.3. Reducir la inflamación intestinal y secreción de fluidos.....	35
3.5.4. Promover la reparación de la mucosa.....	36
3.5.5. Restablecer la microflora intestinal normal.....	36
3.5.6. Reducción de la inflamación.....	37
4. Subsalicilato de Bismuto.....	38
4.1. Empleo farmacéutico.....	40
4.2. Mecanismo de acción.....	41
V DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	45
1. Cuadro metodológico.....	45
2. Materiales y métodos.....	47
2.1. Localización.....	47
2.2. Animales.....	47
2.3. Material de laboratorio.....	47
2.4. Equipo e instrumentos.....	49
2.5. Reactivos y sustancias.....	49
2.5.1. Subsalicilato de bismuto.....	49
2.5.2. Glicerina.....	50
2.5.3. Optiphen™ (Fenoxietanol y caprilil glicol).....	50
2.5.4. Silicato de magnesio y aluminio.....	50
2.5.5. Raphitix™ A-60 (Poliacrilato de sodio, Polideceno hidrogenado y Trideceth-6).....	51



Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal	<u>Índice</u>
2.5.6. Aerosil® (Dióxido de silicio).....	51
2.5.7. PEG 400 (Polietilenglicol 400).....	51
2.5.8. Natrosol™ 250 HHX (Hidroxietilcelulosa).....	51
2.6. Diseño Experimental.....	52
2.6.1. Atributos de calidad requeridos de la pasta.....	53
2.6.2. Velocidad de flujo.....	54
2.6.3. Densidad.....	54
2.6.4. Pruebas a realizar a la formulación óptima.....	55
2.6.4.1. Estabilidad física con el espectro de infrarrojo cercano.....	56
2.6.4.2. Efecto de la pasta sobre la flora bacteriana de interés en heces de equinos clínicamente sanos y con diarrea.....	57
VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
1. Atributos de calidad requeridos de la pasta.....	58
2. Resultados de las variables de respuesta del diseño experimental.....	61
3. Velocidad de flujo de las pastas (Y ₁).....	62
4. Densidad de las pastas (Y ₂).....	65
5. Fórmula seleccionada como óptima.....	69
6. Caracterización de la Fórmula 8 con código de lote P-GA-03 considerada como óptima.....	70
7. Pruebas bacteriológicas en heces de equino.....	72
VII CONCLUSIONES.....	77
VIII PERSPECTIVAS.....	78
IX ANEXOS.....	79
1. Procedimientos.....	79
1.1. Procedimiento para la evaluación de los atributos de calidad requeridos de la pasta.....	79
1.2. Procedimiento para la evaluación de la velocidad de flujo.....	79
1.3. Procedimiento para la evaluación de la densidad.....	81



1.4. Procedimiento para las pruebas de estabilidad de la pasta seleccionada como óptima (P-GA-03).....	82
1.5. Procedimiento para la obtención de muestra de heces.....	82
1.5.1. Para el estudio empleando la suspensión a base de Subsalicilato de Bismuto existente en el mercado nacional.....	83
1.5.2. Para el estudio empleando la pasta en desarrollo a base de Subsalicilato de Bismuto.....	84
1.5.2.1. Equinos clínicamente sanos.....	84
1.5.2.2. Equino con diarrea.....	84
1.6. Procedimiento para la identificación de grupos bacterianos y conteo de UFC de interés en muestra de heces.....	85
2. Formulaciones de las pastas de Subsalicilato de Bismuto.....	88
IX REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	89

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Niveles de los factores del diseño experimental.	52
Tabla 2. Diseño experimental para estudiar el efecto de los excipientes sobre las variables de respuesta implicadas en este estudio.	52
Tabla 3. Especificaciones de la pasta óptima.	53
Tabla 4. Atributos observados en las pastas obtenidas a través del diseño experimental después de un mes de su fabricación.	59
Tabla 5. Resultados de las variables de respuesta del diseño experimental Plackett-Burman con 7 factores.	62
Tabla 6. Análisis de variancia que se aplicó para comparar la velocidad de flujo de las diez fórmulas del diseño experimental.	62
Tabla 7. Análisis de variancia que se aplicó para comparar la densidad de las diez fórmulas del diseño experimental.	66
Tabla 8. Composición de la Fórmula 8 con código de lote P-GA-03 considerada como óptima.	69
Tabla 9. Comparación del conteo de Unidades Formadoras de Colonias de mesófilos en heces de equinos tratados con Subsalicilato de Bismuto en suspensión comercial o pasta óptima seleccionada (P-GA-03).	73
Tabla 10. Comparación del conteo de Unidades Formadoras de Colonias de coliformes en heces de equinos tratados con Subsalicilato de Bismuto en suspensión comercial o pasta óptima seleccionada (P-GA-03).	73
Tabla 11. Descripción de las diez formulaciones de la pasta de Subsalicilato de Bismuto utilizando diferentes porcentajes de glicerina y agua así como distintos modificadores reológicos y un conservador. (Todas las formulaciones contienen 0.1% de Optiphen como conservador).	88

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estómago aislado e intestinos del caballo (McCracken <i>et al.</i> , 1999).	6
Figura 2. Estructura química del Subsalicilato de Bismuto.	38
Figura 3. Diagrama de flujo de las pruebas realizadas a la pasta seleccionada como óptima.	56
Figura 4. Agrupación de las diez diferentes formulaciones para la evaluación de los atributos de calidad de las pastas.	58
Figura 5. Aspecto de las pastas de las diez fórmulas del diseño experimental, recién elaboradas y a un mes de almacenamiento.	60
Figura 6. Comparación de las medias de las velocidades de flujo de las diez fórmulas del diseño experimental. Los intervalos mostrados están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con 95% de confianza. Se marcó con un círculo rojo la formulación óptima.	63
Figura 7. Coeficientes del modelo determinado para la velocidad de flujo (Y_1) de la pasta, graficados en orden decreciente de afectación de los factores a la variable de respuesta Y_1 .	65
Figura 8. Comparación de las medias de las densidades de las diez formulas del diseño experimental. Los intervalos mostrados están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con 95% de confianza. Se marcó con un círculo rojo la formulación óptima.	66
Figura 9. Coeficientes del modelo determinado para la densidad (Y_2) de las pastas, graficados en orden decreciente de afectación de los factores a la variable de respuesta Y_2 .	68
Figura 10. Imágenes de la formulación óptima seleccionada después de las pruebas de evaluación de atributos de calidad, velocidad de flujo y densidad. A) Observación visual de la estabilidad física; B) Jeringa contenedora de la pasta P-GA-03 con dosis de 9 g de Subsalicilato de Bismuto.	69
Figura 11. Comparación de los espectros del NIR del Subsalicilato de Bismuto y de la formulación óptima seleccionada (P-GA-03) al tiempo cero previo a someterla bajo condiciones de estrés.	71
Figura 12. Espectros de NIR de la Fórmula 8, con código de lote P-GA-03 evaluada a los 0, 60 y 160 días de encontrarse bajo condiciones de luz ultravioleta.	71
Figura 13. Espectros de NIR de la Fórmula 8, con código de lote P-GA-03 evaluada a los 0, 60 y 160 días de encontrarse bajo condiciones de temperatura de 60°C.	72
Figura 14. Gráfico que muestra el conteo bacteriológico de mesófilos en heces pos-tratamiento con SSB en pasta en un equino con diarrea.	75

Figura 15. Gráfico que muestra el conteo bacteriológico de coliformes en heces pos-tratamiento con SSB en pasta en un equino con diarrea.	75
Figura 16. Imágenes de los procedimientos realizados para las pruebas bacteriológicas post-tratamiento con SSB en suspensión (comercial) y pasta. A) y B) Administración de SSB en suspensión comercial, C) y D) Administración de SSB en pasta (P-GA-03).	86
Figura 17. Imágenes de los procedimientos realizados para las pruebas bacteriológicas post-tratamiento con SSB en suspensión (comercial) y pasta. A) Obtención de muestra fecal, B) Diluciones logarítmicas, C) Siembra de cada dilución en medios de Agar Verde Brillante, MacConkey y Cuenta Estándar, D) Cultivos bacterianos a las 24 horas.	87

TABLA DE ABREVIATURAS

ADH	Alcohol deshidrogenasa
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
AGVs	Ácidos grasos volátiles
C.	<i>Clostridium</i>
CDD	Colitis dorsal derecha
cm	centímetro
COX	Ciclooxigenasa
DH	deshidratación
EDTA-K ₃	Ácido etilendiaminotetraacético sal tripotásica
ej.	ejemplo
Excip.	Excipientes
FF	Forma farmacéutica
FES-C	Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
g	gramo
hrs.	horas
HE	Hospital de Equinos
HNO ₃	ácido nítrico
kg	kilogramo
L.	<i>Lactobacillus</i>
LPS	Lipopolisacáridos
m	metro
mg	miligramo
mL	mililitro
Mm	milímetro
MP	Materia prima
N	Normal
NIR	Infrarrojo cercano
nm	nanómetros
NoV	Norovirus
NR	No realizado
NSG	Nasogástrica
PA	Principio activo
PC	Peso corporal
pH	potencial de hidrogeniones
SiMgAL	Silicato de magnesio y aluminio
SSB	Subsalicilato de Bismuto
S.	<i>Streptococcus</i>
spp.	especie
TGI	Tracto gastrointestinal
UE	Unidad Experimental



UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UIM	Unidad de Investigación Multidisciplinaria
U.P.M.	Unidad de Policía Metropolitana
USP	United States Pharmacopeia
UV - Vis	Espectroscopia ultravioleta-visible

I. INTRODUCCIÓN

La diarrea amenaza potencialmente la vida, causada por un número de diferentes etiologías, que puede resultar en aberraciones en la homeostasis de fluidos y electrolitos y, en casos severos, incrementar la absorción de productos bacterianos y toxinas hacia la circulación sistémica (Stampfli *et al.*, 1992). Por tal motivo se ha sugerido que el Subsalicilato de Bismuto disminuye la inflamación y secreción en el colon mayor y puede entonces ser benéfico en el tratamiento de la diarrea equina (Feary y Hassel, 2006).

Extrapolando las dosis de la medicina humana, volúmenes mayores de un litro, son requeridos en el paciente equino adulto (Clark *et al.*, 1996; Lawler *et al.*, 2008). Así el desarrollo de esta formulación permitiría disminuir los grandes volúmenes de medicamento a utilizar. Por otro lado, se trata de una innovación ya que se emplearía la vía oral en lugar de la vía nasogástrica, lo que representa una forma de administración más práctica para el médico veterinario e incluso para el propietario quien podría administrarlo bajo prescripción médica al paciente en la misma explotación o cuadra. Al mismo tiempo, esta forma de administración disminuiría de manera importante el factor estrés al reducir el manejo del paciente el cual se encuentra en muchas ocasiones, inmunodeprimido y/o inmunocomprometido.

El presente trabajo se compone de 9 partes incluyendo la actual introducción. Después de la misma se muestra la justificación de la investigación realizada así como la hipótesis planteada. Posteriormente se enumeran los objetivos los cuales se encuentran seguidos del marco teórico que sustentan el trabajo. Posteriormente se explica el desarrollo experimental el cual comprende la elaboración de distintas formulaciones en pasta basada en un diseño de Plackett-Burman de siete factores con dos niveles cada uno. A continuación se describen las distintas pruebas empleadas para la evaluación de las características fisicoquímicas de dichas pastas. Se llevó a cabo la selección de una formulación con las características deseadas la cual fue administrada a distintos caballos para realizar cultivos y conteos en muestras de heces de algunos grupos bacterianos representativos de la flora colónica de los caballos y



Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal Introducción

conocer el comportamiento de los mismos después de la administración de dicha pasta. En seguida se explican los resultados y el análisis de los mismos para continuar con las conclusiones del presente trabajo de investigación. Al finalizar se encuentran los anexos así como la referencia bibliográfica consultada.

II. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

A. Justificación

Los trastornos digestivos en los equinos se presentan de manera común en la práctica clínica, tanto a nivel ambulatorio, así como en hospitales. El tracto gastrointestinal es uno de los sistemas más afectados en la especie y por lo tanto es de frecuente consulta o ingreso a hospitalización.

En la industria farmacéutica veterinaria actual se encuentra disponible la presentación en suspensión lo que implica administrar grandes cantidades del producto empléandose la vía nasogástrica a intervalos de 8, 12 a 24 horas, lo que representa un manejo constante del paciente equino contribuyendo al estrés del mismo.

El estudio se propone, dado que en el Hospital de Equinos de FES-Cuautitlán se ingresan en su mayoría casos de problemas que afectan al sistema digestivo, predisponiendo a la presentación de diarrea, siendo ésta una de las complicaciones nosocomiales más frecuentes.

B. Hipótesis

El diseño y desarrollo de una formulación óptima para la obtención de una pasta a base de Subsalicilato de Bismuto facilitará la administración de los tratamientos a la especie equina. Después de ser administrada en intervalos regulares, se podrá reducir y/o mantener los conteos de los grupos bacterianos más importantes que se encuentran probablemente involucrados en la presentación de los cuadros de diarrea, reduciendo los signos que la acompañan.

III. OBJETIVOS

A. Objetivo general

Desarrollar una fórmula innovadora en pasta para facilitar la administración de Subsalicilato de Bismuto con el fin de sustituir su administración nasogástrica y poder administrarla vía oral y con ello disminuir el estrés en el equino.

B. Objetivos particulares

1. Definir un diseño experimental para seleccionar los componentes de la formulación de una pasta con Subsalicilato de Bismuto para su administración vía oral.
2. Definir atributos de calidad de un prototipo de pasta para su administración oral.
3. Seleccionar una formulación que esté conforme a los atributos de calidad definidos para el prototipo de pasta.
4. Caracterizar la pasta que cumple con los atributos de calidad previamente establecidos utilizando el infrarrojo cercano y su comportamiento sobre la flora bacteriana en heces de equinos.

IV. MARCO TEÓRICO

1. Tracto gastrointestinal del equino

1.1. Anatomía

El tracto gastrointestinal de un herbívoro típico consiste en cavidad oral, faringe, esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso y recto. Se extiende a través del cuerpo y se encuentra en gran parte dentro de la cavidad abdominal (Al Jassim y Andrews, 2009).

Los caballos son mejor descritos como fermentadores en el intestino posterior con un ciego aumentado y colon que alberga una comunidad microbiana compleja. Estos microbios contribuyen a los procesos digestivos que habilitan al caballo para extraer energía de los componentes dietarios que de otra manera serían desperdiciados. Además de la fermentación en el intestino posterior, una fermentación extensa ocurre en el estómago cuando los caballos consumen dietas ricas en carbohidratos no estructurales. Las características anatómicas y fisiológicas del sistema digestivo del caballo necesitan ser consideradas cuando se decide con qué alimentar los caballos (Al Jassim y Andrews, 2009).

1.2. Los segmentos más caudales del tracto gastrointestinal

El intestino grueso (colon mayor del equino) consiste del ciego, colon y recto (Figura 1) los cuales albergan una población microbiana compleja. Las condiciones en el intestino grueso coinciden con la descripción de un reactor químico continuo, en el cual la entrada de los nutrientes es continua, la mezcla es adecuada, los productos son removidos y los reactivos están en contacto con las enzimas producidas ya sea por el cuerpo del animal o por los microbios del tracto gastrointestinal (TGI). La mezcla de los contenidos permite el control sobre la temperatura, pH y la eliminación de los gases. El intestino grueso comprende aproximadamente el 64% del volumen del TGI equino, pero solo 30% de su longitud total

(Kohnke *et al.*, 1999). Es un órgano voluminoso pero corto, que sostiene aproximadamente 95 a 112 litros de líquido, aproximadamente el tamaño del estómago compartamental de una vaca adulta. Es similar al rumen, en el hecho de estar habitado por una comunidad microbiana fermentativa. Las paredes del intestino grueso carecen de vellosidades y las células epiteliales carecen de microvellosidades, pero contienen glándulas para secretar moco. Las paredes del intestino grueso también contienen fibras musculares longitudinales y circulares. A diferencia de otros herbívoros, el intestino delgado del caballo se abre directamente hacia el ciego, el primer segmento del intestino grueso, a través de una válvula muscular. Relativamente cerca a esta válvula hay otra segunda válvula donde el alimento pasa del ciego hacia el colon ventral derecho (Al Jassim y Andrews, 2009).

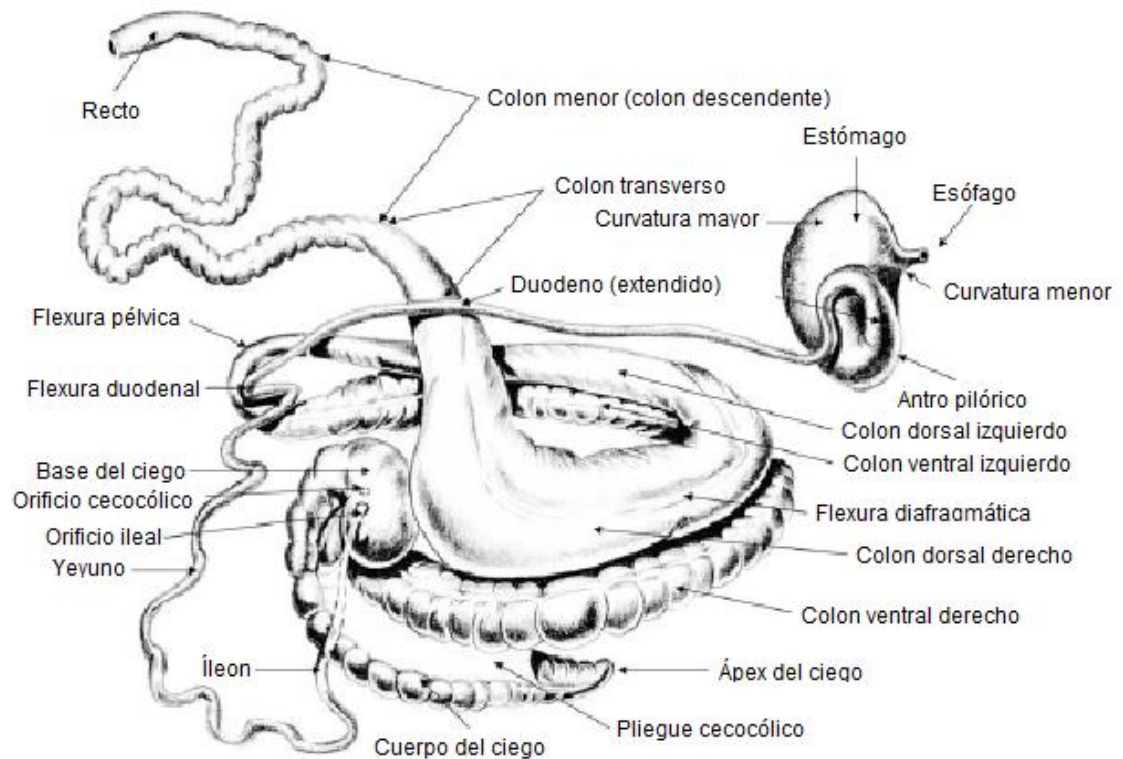


Figura 1. Estómago aislado e intestinos del caballo (McCracken *et al.*, 1999).

El ciego es una estructura grande, ciega, en forma de coma de aproximadamente 1 m de longitud con una capacidad entre 25 y 35 litros. Se extiende desde la entrada pélvica hacia el piso abdominal dentro del área del flanco derecho del caballo. La base del ciego se extiende hacia adelante para extenderse debajo de la cobertura de las últimas costillas, con su ápice justo detrás del diafragma. El intestino grueso en el caballo no tiene una capa muscular longitudinal. En cambio, tiene bandas de músculo (llamadas “tenias”) que siguen la longitud del ciego y unen la pared cecal en saculaciones llamadas “haustras”. El haustra actúa como depósito, retardando el transporte del quimo a través del intestino grueso y contribuyendo a la mezcla de los contenidos colónicos (Al Jassim y Andrews, 2009).

En el caballo el colon ascendente es llamado “colon mayor” y consisten en un colon ventral y un colon dorsal (Reece, 1997). El primer segmento o colon ventral, puede sostener un volumen de aproximadamente 150 litros, tiene un diámetro de 250 a 300 mm, y tiene alrededor de 2 a 4 m de longitud. La transición entre el colon ventral y el colon dorsal es estrecha; este segmento estrecho retarda el transporte de partículas grandes del colon ventral hacia el colon dorsal, incrementando su tiempo de retención y fermentabilidad. El diámetro varía significativamente entre regiones, pero es más grande en el colon dorsal derecho, formando saculaciones con un diámetro de 500 mm. El colon mayor está doblado de manera que forma una doble vuelta consistiendo de los colones ventral derecho e izquierdo y los colones dorsales izquierdo y derecho. Las cuatro partes del colon mayor están conectadas por estructuras llamadas las flexuras “esternal”, “pélvica” y “diafragmática”. Su importancia descansa probablemente en las diferencias en las poblaciones microbianas y funciones de los segmentos (Frape, 1998). El colon menor o descendente une el colon dorsal al recto y tiene aproximadamente 3 m de longitud. El recto tiene aproximadamente 30 cm de longitud y es la continuación del colon menor en la entrada, terminando en el ano. Debido al tamaño, localización e importancia en la digestión, el intestino grueso del equino puede ser referido como “intestino posterior” (Al Jassim y Andrews, 2009).

1.3. Intestino grueso del equino

Teniendo pasto como alimento básico, los caballos son dependientes del uso de la energía química provista por los carbohidratos estructurales de las plantas. Ya que las enzimas para su degradación no son producidas endógenamente, el caballo depende de la fermentación microbiana en el intestino grueso. La ampliación de esta parte del tracto gastrointestinal es característico de los caballos. El ciego y el colon del equino representan el 65% del volumen del TGI (Frape, 2004), facilitando la fermentación de la fibra.

1.4. Digestión de la fibra

Para hidrolizar la fibra, los microorganismos necesitan un tiempo relativamente largo, lo cual es apoyado por la tasa lenta de paso en el intestino grueso. El pH considerablemente alto en el intestino posterior, cercano a lo neutral, también apoya el ambiente favorable para la población microbiana que degrada la fibra. La fermentación de la fibra resulta en la producción de ácidos grasos volátiles de cadena corta, principalmente acetato, propionato y butirato, los cuales son absorbidos en el flujo sanguíneo y son usados como fuente de producción de ATP. Los AGVs representan la principal fuente de energía en los caballos que pastan con proporciones molares de 85:10:3 para acetato, propionato y butirato en el intestino posterior (Mackie y Wilkins, 1988).

2. Microbiología del tracto gastrointestinal del caballo

La microbiota intestinal es compleja y tiene impactos en la digestión, la estimulación inmune, la protección contra patógenos y el metabolismo en el hombre y animales (Costa y Weese, 2012). A pesar de su importancia, la comunidad microbiana del intestino posterior del equino ha recibido poca atención científica (Mackie y Wilkins, 1988; Daly *et al.*, 2001; Endo *et al.*, 2007) comparado con la microbiota de otras especies (Simpson *et al.*, 2000; Eckburg *et al.*, 2005; Sundset *et al.*, 2009).

De acuerdo con Gronvold *et al.* (2010), debido a la apariencia individual de la microbiota de cada caballo en su estudio, cada caballo puede servir como su propio control si el mismo es suficientemente muestreado antes de cualquier intervención.

Los trastornos de la microbiota (disbiosis) pueden ser asociados con un amplio rango de enfermedades en el tracto intestinal y más allá (Jones *et al.*, 2014). Las enfermedades asociadas con cambios en la microbiota en caballos incluyen colitis (Costa *et al.*, 2012), laminitis (Milinovich *et al.*, 2007; Steelman *et al.*, 2012), enfermedad de los pastos (Garrett *et al.*, 2002) y cólico (Weese *et al.*, 2014).

Los caballos sometidos a anestesia y cirugía ocasionalmente desarrollan enfermedad gastrointestinal como diarrea, colitis y cólico (Andersen *et al.*, 2006; Nelson *et al.* 2013). Las razones subyacentes de esto no son claras y podrían involucrar alteraciones en la microbiota intestinal por estrés del transporte, ayuno, efectos de los agentes anestésicos, impacto de la cirugía o la terapia antimicrobiana (Gronvold *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2012). Se ha mostrado que la administración de medicamentos incluyendo antibióticos, antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y otros fármacos, transporte, ayuno y cambios abruptos en la dieta inducen cambios de la microbiota intestinal equina (Willing *et al.*, 2009; Gronvold *et al.*, 2010; Perkins *et al.*, 2012).

Después del transporte y el ayuno, hubo una tendencia a disminuir los Clostridiales, los cuales son componentes nucleares de la microbiota intestinal del equino (Costa *et al.*, 2012; Shepherd *et al.*, 2012). Solo *C. difficile* y *C. perfringens* son enteropatógenos conocidos en animales, mientras que la mayoría de los miembros de este orden son bacterias celulolíticas importantes con diversas funciones (Songer, 1996). Un decremento de Clostridiales también fue observado en caballos afectados con colitis aguda, indicando un enlace potencial de este orden a la enfermedad gastrointestinal (Costa *et al.*, 2012).

Fueron identificados cambios significativos en la estructura de la microbiota después de la anestesia, sugiriendo que la anestesia tiene un efecto medible en la estructura de la comunidad microbiana, potencialmente similar a lo que fue demostrado en caballos afectados por colitis (Costa *et al.*, 2012). La composición microbiana fecal no refleja completamente la composición microbiana de diferentes regiones en el tracto gastrointestinal, haciendo la interpretación más difícil (Dougal *et al.*, 2012; Schoster *et al.*, 2013). Sin embargo, cada vez hay más evidencia de que la dieta tiene un efecto significativo en la microbiota de los caballos (Daly *et al.*, 2012; Dougal *et al.*, 2014; Fernandes *et al.*, 2014; Proudman *et al.*, 2014), mientras que una estabilidad temporal de la microbiota es alta cuando son alimentados con la misma dieta (Blackmore *et al.*, 2013).

Se sabe que un pH intestinal y del tracto posterior ≤ 6.0 inhibe las bacterias celulolíticas y protozoarios y favorece el crecimiento de bacterias tolerantes al ácido como *Streptococcus bovis/equinus* y *Lactobacillus* spp. (Al Jassim y Rowe, 1999; Schwartzkopf *et al.*, 2003). Un pH cecal de 6.0 se considera que representa una acidosis subclínica (Radicke *et al.*, 1991), y un pH del intestino posterior menor a 6 está asociado con condiciones clínicas como una diarrea osmótica, sobrecrecimiento de bacterias gram-positivas y lisis de bacterias gram-negativas lo cual puede culminar en laminitis en los caballos (Garner *et al.*, 1978).

Mackie y Wilkins (1988) reportaron mayor población bacteriana en las partes distales del TGI entre el duodeno y el colon. Los caballos que fueron alimentados con una dieta de pasto tuvieron una población bacteriana de 2.9×10^6 /g peso húmedo en el duodeno, 29.0×10^6 en el yeyuno, 38.4×10^6 en el íleon, 2.05×10^9 en el ciego, y 1.26×10^9 en el colon. Al Jassim y Andrews (2009) obtienen a menudo conteos para anaerobios totales de alrededor de 4.3×10^8 en el estómago, 4.2×10^8 en el ciego, 1.0×10^8 en el colon proximal, 6.7×10^7 en el colon distal, y 1.7×10^8 en el recto.

2.1. Población microbiana en el intestino grueso

El intestino grueso ofrece un ambiente favorable para microbios, el pH es neutro y la tasa de paso es lenta. Consecuentemente la población microbiana en el intestino posterior es diversa y está presente en cantidades de 10^9 en el ciego y 10^8 en el colon (Mackie y Wilkins, 1988). La concentración de zoosporas fúngicas es alrededor de 10 a 10^4 /mL en el contenido cecal (Julliand, 2005) y 10^3 a 10^5 /mL de protozoarios también es descrita en el contenido del ciego y colon con grandes variaciones individuales (Kern *et al.*, 1973; Moore y Dehority, 1993).

Los números de bacterias celulolíticas varían de 10^4 a 10^7 por mL en el contenido intestinal (Kern *et al.*, 1973; Jullian *et al.*, 2001) con mayor abundancia en el ciego que en el colon, indicando que es el ciego probablemente el principal sitio de digestión de la fibra. Julliand *et al.* (1999) identificaron *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus* y *Fibrobacter succinogenes* son las especies bacterianas celulolíticas principales en el ciego equino, mientras que Daly *et al.* (2001) describieron *Clostridium* spp., *Ruminococcus* spp., *Butyrivibrio* spp. y *Eubacterium* spp. como los organismos celulolíticos y fibrolíticos más importantes.

Streptococci y *Lactobacilli* son consideradas las principales bacterias glicolíticas y amilolíticas en el intestino posterior. *Streptococcus bovis* y *S. equinus* (Julliand, 2005), así como *Lactobacillus salivarius*, *L. mucosae*, *L. delbrueckii* y *Mitsuokella jalaludinii* (Al Jassim *et al.*, 2005) fueron reportados como los productores dominantes de ácido láctico, mientras que *Veillonella* sp. y *Megasphaera* spp. son los principales habitantes que utilizan lactato en el intestino posterior (Julliand, 2005).

Un número relativamente alto de bacterias proteolíticas (10^8 bacteria/g) ha sido encontrado en el ciego (Kern *et al.*, 1973; Mackie y Wilkins, 1988), lo cual sugiere que hay una disponibilidad sustancial de proteínas para la degradación microbiana.

Los carbohidratos fácilmente fermentables, como el almidón, son digeridos eficientemente por las enzimas propias de los caballos produciendo glucosa como fuente de energía. Sin embargo, el almidón también es utilizado eficientemente por bacterias en el TGI, principalmente por bacterias productoras de ácido láctico como *Streptococcus* y *Lactobacilli* (Varloud *et al.*, 2007). Esto resulta en la producción de grandes cantidades de lactato a través del TGI y la producción de AGVs con una mayor proporción de propionato (Hintz *et al.*, 1971).

3. Diarrea en el equino

La microflora intestinal normal tiene un efecto protector contra patógenos exógenos pero también contra la proliferación de bacterias oportunistas endógenas, un fenómeno denominado resistencia a la colonización (Vollard y Clasener, 1994). Así la diarrea se define como un contenido de agua incrementado en las heces comparado con la homeostasis. La diarrea aguda es el signo clínico de enfermedad del colon mayor (tiflocólica) en caballos adultos. Frecuentemente, los signos clínicos principales incluyen cólico, deshidratación y endotoxemia, los cuales algunas veces progresan rápidamente hacia el choque y ocasionalmente hacia la muerte. La diarrea es una condición que amenaza potencialmente la vida causada por un número de diferentes etiologías (Stampfli *et al.*, 1992) y cuyas causas patológicas subyacentes son en su mayoría alteraciones en la flora del colon resultando en sobrecrecimiento de patógenos y alteraciones en la motilidad gastrointestinal así como pérdidas de fluido intestinal y electrolitos y desequilibrios ácido-base (Oliver y Stampfli, 2006) y en casos severos, incrementar la absorción de productos bacterianos y toxinas hacia la circulación sistémica (Stampfli *et al.*, 1992). La diarrea aguda puede ser ligeramente diferente en los potros y en los caballos adultos, debido a las diferencias en los agentes infecciosos causantes, el sitio intestinal afectado y la diferente capacidad de absorción del colon. La causa inicial del problema de la diarrea aguda es frecuentemente (>60% de los casos) no determinada. La colitis aguda también produce rápidamente condiciones catabólicas severas con marcada pérdida de peso aguda (Oliver y Stampfli, 2006).

El desarrollo de diarrea entre caballos hospitalizados es una preocupación mayor para hospitales veterinarios equinos y centros de remisión. Es una complicación potencial de hospitalización para procedimientos quirúrgicos o médicos y puede contribuir a la morbilidad y mortalidad de caballos con enfermedades gastrointestinales y no gastrointestinales. Desafortunadamente, puede ser difícil señalar la causa exacta de diarrea aguda o colitis, y en la mayoría de los casos, el agente etiológico específico es presuntivo o indeterminado (Chapman, 2009).

3.1. Presentación clínica de la diarrea

La diarrea aguda y colitis pueden ser especialmente alarmantes para los propietarios y veterinarios cuando ocurre en caballos admitidos en un hospital veterinario para procedimientos de rutina o electivos, particularmente procedimientos no relacionados con una enfermedad gastrointestinal. El monitoreo cercano durante la estancia hospitalaria es importante para el reconocimiento temprano de una colitis en desarrollo. Los parámetros clínicos que deben ser monitoreados estrechamente incluyen temperatura rectal, ritmo cardíaco, ritmo respiratorio, hidratación, color y calidad de membranas mucosas, tiempo de retorno capilar, apetito y carácter y frecuencia de defecación. Si la excreción fecal se vuelve más líquida pero la frecuencia de defecación y los parámetros clínicos permanecen normales, esto puede representar una diarrea leve de consecuencias mínimas. Unas heces acuosas con sangre o un mal olor que persiste y que es acompañada con fiebre, taquicardia, taquipnea, membranas mucosas hiperémicas inyectadas, deshidratación, pérdida del apetito, depresión, y signos de incomodidad abdominal sugieren la existencia de una condición más seria. En la mayoría de los casos, los parámetros clínicos anormales preceden al establecimiento de una diarrea. En ese caso, los diagnósticos deben hacerse inmediatamente para identificar el estado hemodinámico del paciente y determinar si se requiere intervención (Chapman, 2009).

3.2. Patofisiología de la diarrea aguda

En aproximadamente el 40% de los caballos presentados con queja de diarrea aguda, la asociación causal puede ser conocida y en aproximadamente 60% de los casos la causa de origen nunca se encuentra (Stämpfli *et al.*, 1992). La diarrea representa una perturbación en el balance normal de fluidos incluyendo un desequilibrio en la secreción de electrolitos y la absorción en el intestino grueso (Cohen y Divers, 1998). Debido a la enorme capacidad de absorción del colon mayor, las lesiones del intestino delgado no causan diarrea en caballos adultos en comparación con otras especies. Se puede ver diarrea de intestino delgado en potros. Existen diferentes mecanismos en el desarrollo de diarrea; estos incluyen hipersecreción, aumento de la permeabilidad (exudación), malabsorción y motilidad anormal (Schiller, 2000; Magdesian y Smith, 2002). Los pacientes con diarrea aguda severa también presentan signos de procesos inflamatorios activos, principalmente en el colon mayor. El problema de la diarrea aguda es la flora intestinal cecocólica. Cualquier “trastornador” de la flora puede crear un medio que libere toxinas bacterianas (lipopolisacáridos [LPS]) induciendo inflamación (citocinas y otros mediadores inflamatorios), dando como resultado una pérdida de líquido hacia el lumen intestinal y daño a las capas celulares y al lecho vascular de la mucosa cecocólica como la formación de edema local, exudación y la absorción de toxinas hacia la sangre. El resultado neto es la pérdida masiva de fluidos, electrolitos, sustancias anticoagulantes y procoagulantes y proteína con signos secundarios como hipovolemia, acidemia, hipoalbuminemia, disturbios de la coagulación y choque cardiovascular y endotóxico (Murray, 1988).

La diarrea puede resultar de manera secundaria a una variedad de causas infecciosas y no infecciosas llevando a un incremento en la secreción de fluidos y electrolitos hacia el lumen intestinal e inflamación causando aumento en la permeabilidad de la pared intestinal. El incremento en la permeabilidad favorece la pérdida de proteínas hacia la luz del intestino y la absorción de productos bacterianos y toxinas hacia la circulación desencadenando respuesta inflamatoria sistémica. Los lipopolisacáridos (LPS) son las toxinas bacterianas

mejor investigadas capaces de incitar una inflamación sistémica en caballos (Mott *et al.*, 1997; Matsuda y Hattori, 2006).

Las alteraciones en los fluidos y electrolitos pueden resultar rápidamente en hipovolemia clínica y deshidratación, las cuales si no son tratadas apropiadamente pueden progresar rápidamente a alteraciones mayores del sistema cardiovascular resultando en una perfusión orgánica reducida y finalmente en disfunción orgánica. La absorción de toxinas puede conducir a una activación sistémica descontrolada de las cascadas inflamatorias y de coagulación (Collatos *et al.*, 1995), resultando en una hipotensión severa y potencialmente amenazante de la vida y a un estado de hipercoagulación (Naylor y Dunkel, 2009).

3.3. Causas de diarrea

Las causas de diarrea pueden ser clasificadas en infecciosas y no infecciosas (Traub-Dargatz *et al.*, 2004). Las no infecciosas incluyen colitis asociada a antimicrobianos, colitis asociada a anti-inflamatorios no esteroidales (AINES) (ej. colitis dorsal derecha), causas relacionadas a la alimentación (sobrecarga de carbohidratos, cambios en la dieta), peritonitis, toxicosis (cantaridina, arsénico, mercurio), enteropatía por arena, neoplasia y enfermedad intestinal inflamatoria (Cohen *et al.*, 2008). Las principales subpoblaciones de caballos hospitalizados reciben antimicrobianos ya sea terapéuticamente para tratar infecciones conocidas o profilácticamente antes de procedimientos quirúrgicos. Los AINES son dados frecuentemente a caballos para causar analgesia antes de la presentación, durante la admisión y durante la estancia hospitalaria. Una sobredosis de AINES induce una colitis severa; sin embargo, reportes en la literatura demuestran que la colitis asociada a AINES puede ocurrir en caballos que reciben la dosis recomendada de fenilbutazona (Cohen *et al.*, 2008) y que la ulceración del tracto gastrointestinal e inflamación pueden ser evidentes tan pronto como desde el inicio de la terapia (McConnico *et al.*, 2008). Las prostaglandinas son inhibidores importantes de inflamación intestinal y ayudan a mantener el flujo sanguíneo de la mucosa;

bloqueando la formación de estas sustancias puede incrementarse la severidad de colitis (Chapman, 2009).

Finalmente, a pesar de los esfuerzos para replicar la dieta normal del paciente equino, muchos caballos son sometidos a un cambio significativo en la dieta durante la hospitalización. Muchos caballos que se presentan por cólico están frecuentemente anoréxicos antes de la admisión, y el alimento se suele retener por periodos de tiempo variables antes y después de los procedimientos quirúrgicos. La pérdida del apetito y alteraciones de la alimentación no causan colitis severa pero la evidencia indica que los cambios en la composición de la dieta pueden alterar la flora entérica (Moore y Dehority, 1993; Kobayash *et al.*, 2006) y contribuir a la enfermedad (Goodson *et al.*, 1988).

Las causas infecciosas de diarrea en caballos incluyen *Salmonella*, enterocolitis clostridial (*Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*), *Neorickettsia risticii*, y ciatostomiasis (Palmer, 1993; Lyons *et al.*, 2000).

Es importante tener en cuenta que el desarrollo de colitis en caballos hospitalizados puede ser multifactorial y ocurrir en conjunto con enfermedades gastrointestinales y no gastrointestinales. Los factores infecciosos y no infecciosos pueden tener un efecto combinado o sinérgico para inducir la enfermedad (Chapman, 2009).

3.3.1. Causas no infecciosas de diarrea

3.3.1.1. Alteraciones en la dieta y sobrecarga de carbohidratos

El líquido del colon del caballo es un ecosistema microbiológico complejo y dinámico compuesto por varios cientos de especies de bacterias, protozoarios y hongos residentes y transitorios (Maczulack *et al.*, 1985). Bacterias comensales y patológicas colonizan el colon equino, de los cuales los bacilos gram-negativos predominan (50%), seguidos de bacilos

gram-positivos (23%), cocos gram-positivos (22%) y finalmente cocos gram-negativos (4%). Las bacterias anaeróbicas son abundantes y juegan un papel vital en la fermentación del intestino grueso. En caballos sanos, los organismos comensales deben competir con bacterias patógenas para sobrevivir en un balance delicado que puede ser interrumpido fácilmente por varias circunstancias. Los estudios han demostrado que las alteraciones en la composición microbiana intestinal pueden ocurrir con cambios en la temporada (Kobayash *et al.*, 2006) y alteraciones en la dieta (Goodson *et al.*, 1988; Jullian *et al.*, 2001). Por ejemplo, la adición de cebada a la dieta de ponies incrementa las bacterias que utilizan el lactato (*Streptococcus spp.* y *Lactobacillus spp.*), disminuyen las bacterias celulolíticas, alteran las concentraciones de AGV y disminuye el pH del colon (Jullian, 2001). Una variedad de condiciones lumbales intestinales (poblaciones bacterianas, pH, nutrientes, tensión de oxígeno) pueden afectar la habilidad de los microorganismos patógenos para invadir (Chapman, 2009).

En la hospitalización, los caballos están sujetos inevitablemente a un cambio de dieta a menos que el propietario provea un suministro de forraje. Generalmente es recomendado imitar la dieta nativa tanto como sea posible y evitar cambios drásticos, especialmente en la cantidad de concentrados ofrecidos durante la estancia hospitalaria. Cambios menores en la dieta no causan diarrea profunda como puede verse con una sobrecarga severa de carbohidratos. Sin embargo, pueden ocurrir cambios sutiles en la flora bacteriana entérica y podrían desempeñar un papel en las infecciones oportunistas con patógenos entéricos como *Salmonella* (Chapman, 2009).

Inversamente, algunos pacientes equinos hospitalizados pueden tener una reducción en la ingesta dietética ya sea voluntariamente (hipofagia, anorexia) o debido a un retiro impuesto antes de los procedimientos quirúrgicos. Puede ser necesaria una retención de alimento extensa en caballos con disfagia o disfunción intestinal y reflujo gástrico (ej. íleo, duodeno-yeyunitis proximal). Cambios perjudiciales en la microflora intestinal (como defaunación) o atrofia de las vellosidades en la mucosa intestinal pueden ocurrir en un ayuno prolongado (más de 72 horas), resultando en diarrea severa. Cuando la ingesta voluntaria está

contraindicada o no es posible, se recomienda una nutrición parenteral o enteral (cuando la función intestinal está presente) para prevenir una diarrea inducida por ayuno (Magdesian, 2003; Sweeny y Hansen, 1990). Sin embargo, se requiere precaución cuando se inicia un programa de nutrición enteral porque una alimentación excesiva después de un periodo extenso de retiro de alimento puede conducir a una colitis severa (Chapman, 2009).

3.3.1.2. Diarrea asociada a antimicrobianos

El intestino parece ser un compartimento farmacocinético relativamente independiente (Vollaard y Clasener, 1994), y la concentración del fármaco activo en el contenido intestinal está determinado por la vía de administración, la dosis administrada, las proporciones del medicamento absorbido del intestino y excretado en la saliva, bilis o moco y el grado en el cual el medicamento es inactivado por el contenido intestinal (Jones, 2000; Wiström *et al.*, 2001; Papich, 2003).

En un ambiente hospitalario, la terapia antimicrobiana puede ser necesaria para tratar infecciones conocidas o puede ser necesaria profilácticamente para prevenir una infección durante los procedimientos quirúrgicos (Southwood, 2006). Los antibióticos perioperatorios desempeñan un papel importante en reducir las infecciones quirúrgicas y mejorar los resultados de los pacientes; sin embargo, no carecen de riesgos en los pacientes equinos. Los antibióticos pueden tener un efecto adverso en la distribución y número de bacterias y protozoarios normales en el ciego y colon interrumpiendo el balance de organismos comensales y patógenos, lo cual puede permitir el sobrecrecimiento de especies patógenas (Papich, 2003). Consecuentemente, ciertos antibióticos con una pobre absorción intestinal como los macrólidos (eritromicina) (Gustafsson *et al.*, 1997) y lincosamidas (lincomicina) (Raisbeck, 1981) y clindamicina han sido asociados con una severa colitis inducida por antibióticos cuando se administran oralmente en modelos experimentales, incluso en dosis bajas (Chapman, 2009).

Los antibióticos parenterales u orales que han sido asociados temporalmente con el inicio de una diarrea aguda incluyen tetraciclinas, lincomicina, eritromicina, cefalosporinas, sulfas-trimetoprim y penicilinas. Los casos de colitis también han sido asociados con la administración de cloxacilina, florfenicol, ampicilina/sulbactam, cloranfenicol y metronidazol, así como con ciprofloxacino más recientemente (Weese *et al.*, 2002).

La diarrea asociada a antibióticos en equinos puede iniciar dentro de las 24 horas de haber administrado una sola dosis de antimicrobiano, pero ocurre más comúnmente en los primeros días después del inicio del tratamiento (Andersson *et al.*, 1971; Cook, 1973; White y Prior, 1982; Prescott *et al.*, 1988; Staempfli *et al.*, 1992; Ensink *et al.*, 1996; Gustafsson *et al.*, 1997; Stratton-Phelps *et al.*, 2000). Weese (2000) reportó que la diarrea comenzó en promedio 5.7 días después del inicio del tratamiento; sin embargo, el comienzo osciló desde un día después del inicio del tratamiento a 7 días después del cese del tratamiento. Curiosamente, en un estudio, al inicio de la diarrea, la administración de antimicrobianos había sido discontinuado por 1-7 días en el 20% (8/40) de los caballos (McGorum y Pirie, 2009).

La administración de oxitetraciclina a caballos causó un cambio marcado en las poblaciones bacterianas fecales dentro de las 24 horas después de la primera dosis (White, 1982). En este estudio, después de la administración de oxitetraciclina, *Veillonella* sp., una flora intestinal normal, desapareció, mientras que coliformes, *Streptococcus* spp. y *Bacteroides* spp. y especies bacterianas patógenas (como *Clostridium perfringens* tipo A) incrementaron (White, 1982). Otros estudios demostraron que las yeguas estaban en riesgo de desarrollar una enterocolitis clostridiana cuando sus potros fueron tratados con eritromicina y rifampicina por infección con *Rhodococcus equi* (Baverud, 1998).

El centro del problema es la alteración de la flora cecocólica normal (White y Prior, 1982). Teóricamente, cualquier antibiótico de amplio espectro tiene el potencial de trastornar la flora protectora local y permitir que los patógenos potenciales “crezcan demasiado” y

causen enfermedad (Hogenauer *et al.*, 1998). Además, los efectos procinéticos directos de los antimicrobianos pueden influenciar la consistencia fecal y la frecuencia de defecación. Los macrólidos como la eritromicina tienen una acción procinética intestinal bien reconocida, debido a la acción directa en los receptores de motilidad del músculo liso y una vía indirecta de estimulación de la liberación de acetilcolina en las neuronas entéricas vía motilina y/o receptores 5-HT. (Roussel *et al.*, 2003).

Los antibióticos parenterales también son capaces de causar diarrea o colitis. Algunos antimicrobianos parenterales se someten a la circulación enterohepática o excreción biliar y son capaces de afectar la microflora intestinal. En un estudio, los caballos hospitalizados que recibieron antibióticos parenterales fueron 10.9 veces más propensos a tener resultados positivos de cultivo fecal de *Salmonella* cuando se compararon con los caballos que no recibieron antibióticos parenterales (Hird, 1984). Este hallazgo sugiere que los antibióticos cambian la relación antagonista de la microflora intestinal para favorecer el crecimiento excesivo de las cepas patógenas. Esencialmente, todos los antibióticos son capaces de causar diarrea en caballos y los propietarios deben ser advertidos de la colitis potencial antes de iniciar una terapia antimicrobiana. Si la diarrea se desarrolla poco tiempo después de iniciada la terapia antimicrobiana, entonces se debe sospechar de una colitis asociada a antibióticos (Buechner, 1989).

La administración antimicrobiana también puede promover la colonización entérica por *C. difficile* en potros. Beier *et al.* (1994) reportaron una alta prevalencia de *C. difficile* y su toxina en las heces de potro que desarrollaron diarrea después de un tratamiento antimicrobiano. Baverud *et al.* (2003) demostraron una mayor prevalencia (44%) de *C. difficile* en las heces de potros no diarreicos que estuvieron recibiendo eritromicina o gentamicina y rifampicina, que de aquellos que recibieron trimetoprim/sulfonamidas y/o penicilina (15%), mientras que *C. difficile* no fue detectada en heces de potros que no recibieron antimicrobianos (Baverud *et al.*, 1998).

Un estudio retrospectivo por Cohen y Woods (1999) demostró que los caballos con diarrea aguda tuvieron 4.5 veces menos probabilidad de sobrevivir si tuvieron una exposición previa a los agentes antimicrobianos comparado con los caballos que no la tuvieron. En este estudio, las sulfonamidas potenciadas o la penicilina G fueron los antimicrobianos administrados más comúnmente antes del desarrollo de la diarrea. Sin embargo, la relación entre los antibióticos y la colitis no siempre es consistente. Otro estudio retrospectivo no encontró una diferencia significativa entre la evidencia histórica y documentada del uso de antimicrobianos y la no sobrevivencia en caballos con enterocolitis idiopática aguda (Stampfli *et al.*, 1991). La relación entre los agentes antimicrobianos y la diarrea es compleja. La mayor controversia de los agentes antimicrobianos es su uso indiscriminado en caballos y sin evidencia documentada de infección bacteriana o con el uso excesivo de antimicrobianos críticos. Una amplia evidencia sugiere que el uso inapropiado de antibióticos contribuye a la aparición de bacterias multirresistentes (Dargatz y Traub-Dargatz, 2004) de las cuales la más preocupante en enfermedad gastrointestinal en equinos es la *Salmonella* multirresistente.

3.3.1.3. Anti-inflamatorios no esteroideos

La diarrea asociada con sobredosis de AINES ha sido documentada experimental y retrospectivamente en caballos (MacAllister *et al.*, 1993; Collins y Tyller, 1984). Clínicamente, la toxicidad con AINES se describe como causante de dos síndromes clínicos: toxicidad generalizada con AINES y colitis dorsal derecha (CDD) (Mott *et al.*, 1997; Karcher *et al.*, 1990). Todos los AINES son potencialmente capaces de causar toxicidad. La CDD es una inflamación ulcerativa localizada del colon dorsal derecho que ha sido asociada con AINES administrados en cantidades excesivas en presencia de deshidratación (Meschter *et al.*, 1990).

La enteropatía asociada a AINES puede ocurrir cuando estos medicamentos son administrados en una dosis apropiada y por breves periodos de tiempo (Cohen *et al.*, 2008;

McConnico *et al.*, 2008) lo cual puede sugerir una respuesta idiosincrática. Estudios recientes han mostrado que la concentración de ácido acético en el colon disminuye significativamente en caballos a los cuales se les administró fenilbutazona por 21 días. Los AGV del colon son importantes subproductos de la fermentación bacteriana para facilitar la absorción de agua en el colon. La terapia prolongada con fenilbutazona a una dosis de 4.4 mg/kg oral puede predisponer al colon a una inflamación (MacConnico *et al.*, 2008). Debido a que los caballos hospitalizados pueden recibir terapia con AINES por periodos prolongados para aliviar dolor y disminuir los signos clínicos asociados con endotoxemia, pueden estar en riesgo de una enteropatía inducida por AINES. La diarrea severa puede no ser el distintivo de esta enfermedad inicialmente, pero el reconocimiento de los signos tempranos, como letargia, anorexia, producción fecal reducida y cólico, es imperativo para iniciar un tratamiento y evitar complicaciones posteriores (Cohen, 2002).

Los signos clínicos más evidentes de una CDD son depresión, anorexia, fiebre, cólico, diarrea, deshidratación y evidencia de endotoxemia. Los signos clínicos de una toxicidad generalizada con AINES pueden variar de signos no sistémicos a diarrea severa acompañada con otros signos de toxicidad, como anorexia, ulceración oral, fiebre y edema periférico (Meschter *et al.*, 1990). Los AINES inhiben la actividad de la ciclooxigenasa (COX 1 y COX 2). Se cree que los AINES, que son inhibidores indiscriminados de la COX 1 y la COX 2, tienen una mayor capacidad de producir mayor toxicidad (ej. fenilbutazona, aspirina). Las lesiones gastrointestinales causadas por AINES se manifiestan como ulceración de la mucosa, sangrado, enteropatía con pérdida de proteína, y una respuesta significativa a los productos microbianos expuestos a la lámina propia (Meschter *et al.*, 1990; Collins y Tyler, 1984).

Es recomendable el monitoreo de laboratorio periódico de los caballos hospitalizados que reciben terapia con AINES para detectar indicadores sutiles de inflamación intestinal (hipoalbuminemia, hipoproteinemia, anemia y neutropenia). Los clínicos deben hacer esfuerzos para limitar el uso de AINES en la dosis más baja posible que proporcione el alivio

del dolor deseado del dolor en el paciente, pero minimiza los efectos secundarios no deseados, particularmente al tracto gastrointestinal (Chapmann, 2009).

3.3.2. Causas infecciosas de diarrea

3.3.2.1. Salmonelosis

La salmonelosis equina ha sido reconocida desde hace tiempo como una causa infecciosa importante de colitis en caballos adultos (Smith, 1981; Bryans *et al.*, 1961). La prevalencia de la eliminación fecal de *Salmonella* spp. se reporta que ocurre en 0.8% en caballos residentes y un 3-13% en caballos hospitalizados (Traub-Dargatz *et al.*, 1990; Traub-Dargatz *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001; Alinovi *et al.*, 2003; Dallap *et al.*, 2012; Hartnack *et al.*, 2012; Ernst *et al.*, 2014;). La diferencia en la prevalencia de la eliminación de *Salmonella* entre estas dos poblaciones es probable que resulte de múltiples factores a los cuales los caballos hospitalizados han estado expuestos, incluyendo el transporte, cambio en el medio ambiente, cambio en la dieta, enfermedad preexistente, cirugía o administración de antimicrobianos (Kim *et al.*, 2001; Alinovi *et al.*, 2003; Ernst *et al.*, 2004; Hartnack *et al.*, 2012).

Salmonella pertenece a una familia de bacterias llamada *Enterobacteriaceae*, que se compone de bacilos facultativos anaeróbicos gram-negativos. El modo principal de transmisión de *Salmonella* es la ruta fecal-oral; sin embargo, la transmisión aérea ha sido demostrada en algunas especies (Centers for Disease Control, 2006). Puede invadir la mucosa faríngea, del intestino delgado y del colon. Invade las células intestinales M, es fagocitada por macrófagos y células dendríticas en la lámina propia y tejido linfoide y luego pasa al torrente sanguíneo (Smith, 1981; Spier, 1993).

Después de la ingestión, el organismo debe sobrevivir al medio ácido del fluido gástrico. La mayoría de las bacterias perecen en el estómago, pero con un inóculo grande,

suficientes bacterias sobreviven para alcanzar el intestino delgado distal y el colon (Oliveira *et al.*, 2006).

Es lógico pensar que los cambios en el contenido y composición intestinal de nutrientes (composición de aminoácidos, carbohidratos) pueden ser necesarios para que *Salmonella* reciba las señales fisiológicas y ambientales para invadir el epitelio intestinal (Gruenheid y Finlay, 2003). *Salmonella* es capaz de entrar a células no fagocíticas, se replica eficientemente y después se disemina a través de una serie compleja de translocaciones celulares. Haciendo explotar las células fagocíticas, *Salmonella* puede propagarse a sitios extraintestinales. Este hecho es evidenciado mediante una infección experimental con *Salmonella typhimurium* en ponies, la cual reveló cultivos positivos de los nodos linfáticos mesentéricos 20 horas después una inoculación quirúrgica en el colon dorsal (Murray *et al.*, 1989).

La característica clásica de una salmonelosis clínica en la mayoría de las especies de vertebrados es una diarrea líquida profusa y voluminosa. Esta diarrea ocurre como resultado de las pérdidas de fluido intestinal por dos mecanismos: (1) pérdida activa de fluido a través de la hiperestimulación secretora y (2) pérdida pasiva de fluido por malabsorción mediada por inflamación. Se pueden observar edema de la mucosa y la submucosa, cambios microvasculares e inflamación neutrofílica secundarias a una infección experimental con *Salmonella* en ponies (Murray *et al.*, 1989). *Salmonella* también produce varios factores de virulencia, incluyendo exotoxina, citotoxina y enterotoxina que median el desarrollo de la diarrea (Murray, 1986). La causa principal de la diarrea es probablemente la habilidad de que *Salmonella* induzca una reacción inflamatoria intestinal severa (Ohl y Miller, 2001). Los efectos sistémicos causados por *Salmonella* pueden ser atribuidos a los LPS, resultando a menudo en discapacidad cardiovascular y liberando factores que desencadenan una respuesta inflamatoria del huésped acumulándose en más daño a los tejidos y signos de endotoxemia (Smith, 1981; Clarke y Gyles, 1993).

Las infecciones más leves suelen ser auto-limitadas y los pacientes generalmente muestran mejoría clínica en un periodo de tiempo relativamente breve. Otra característica clínica importante de la salmonelosis es la posibilidad de que algunos animales infectados diseminen el organismo sin demostrar los signos clínicos de la enfermedad (eliminador silencioso) (Smith *et al.*, 1979).

En poblaciones de caballos altamente concentradas, la infección por *Salmonella* es de una preocupación particular. Los brotes han ocurrido en hospitales veterinarios de remisión, en granjas de cría y en hipódromos. Los centros veterinarios de referencia son de particular preocupación porque las congregaciones de animales potencialmente susceptibles están sujetas a mezclas en estas instalaciones. La transmisión horizontal de la enfermedad es una preocupación particular en estas situaciones. Existen numerosos reportes de brotes de *Salmonella* dentro de los hospitales veterinarios (Baker, 1969; Dorn *et al.*, 1975; Carter *et al.*, 1986; Donahue, 1986; Powell *et al.*, 1988; Castor *et al.*, 1989; Hartman y West, 1995; Hartmann *et al.*, 1996; Pare *et al.*, 1996; Tillotson *et al.*, 1997; Amavisit *et al.*, 2001; Schott *et al.*, 2001; Weese *et al.*, 2001; Ranking, 2005; Ward *et al.*, 2005). La mayoría de estos brotes infecciosos son causados por cepas de *Salmonella* resistentes a múltiples fármacos. Los estudios de salmonelosis en caballos en centros veterinarios de referencia han identificado factores de riesgo que incrementan la probabilidad de una infección durante la hospitalización (Hird *et al.*, 1986; Mainar-Jaime *et al.*, 1998; House *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001; Alinovi *et al.*, 2003; Ernst *et al.*, 2004) o durante un brote (Traub-Dargatz *et al.*, 1990; Tillotson *et al.*, 1997; Schott *et al.*, 2001). A pesar de algunas inconsistencias entre estos estudios, posiblemente debido a las diferencias en las poblaciones de muestra o a las técnicas de muestreo, existen muchos factores de riesgo similares. Los caballos que recibieron terapia con antibióticos (Hird *et al.*, 1986; House *et al.*, 1999; Ernst *et al.*, 2004) y que estuvieron sometidos a restricción de piensos o cambios en la dieta (Traub-Dargatz *et al.*, 1990; House *et al.*, 1999) estuvieron en mayor riesgo de desarrollar salmonelosis; esto es más probable debido a las alteraciones en la microflora entérica. En otro estudio, los potros estuvieron en mayor riesgo de una infección por *Salmonella* (Ernst *et al.*, 2004), muy probablemente

debido a una inmunocompetencia reducida, falta de una microflora competidora y coprofagia (Chapman, 2009).

Los factores de riesgo establecidos que se asocian con la progresión de una infección latente a una infección nosocomial de eliminación activa y enfermedad clínica incluyen “estresores” como el transporte (Owen *et al.*, 1983), desórdenes del TGI (Schott *et al.*, 2001; Ernst *et al.*, 2004), temperatura ambiental alta (Carter *et al.*, 1986; House *et al.*, 1999), y terapia antimicrobiana (House *et al.*, 1999; Schott *et al.*, 2001; Ernst *et al.*, 2004).

El estrés también puede desempeñar un papel en la infección por *Salmonella* porque varios estudios encontraron que el transporte prolongado (Owen *et al.*, 1983; Kim *et al.*, 2001) o exposición al calor (House *et al.*, 1999) incrementan la probabilidad de salmonelosis. Otros estresores que han sido identificados incluyen cirugía mayor, particularmente cirugía abdominal (Baker, 1970; Smith *et al.* 1978; Ernst *et al.*, 2004; Ekiri *et al.*, 2008), enfermedad gastrointestinal (Hird *et al.*, 1984; Hird *et al.*, 1986; Weese *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001; Ernst *et al.*, 2004) y enfermedad respiratoria (Alinovi *et al.*, 2003). En general, estos estudios sugirieron que los factores que influyen en la infección no son exclusivos y pueden variar dentro y entre los hospitales veterinarios (Chapmann, 2009).

La incidencia de una infección zoonótica en personas que se encargan de los caballos infectados con *Salmonella* es desconocida. Sin embargo, en un estudio, *Salmonella* no fue aislada de las heces del personal asociado con un hospital veterinario de enseñanza durante un brote de salmonelosis (Tillotson *et al.*, 1997). Otro estudio encontró que *Salmonella* fue identificada en los hogares del personal que tiene contacto regular con el ganado infectado (Rice *et al.*, 2008). Se ha sugerido que la enteritis por *Salmonella* en personas está subnotificado y que la diferenciación entre la transmisión zoonótica de la enfermedad transmitida por alimentos puede ser difícil; el verdadero riesgo para la transmisión del organismo de los caballos a las personas sigue siendo impreciso (Chapmann, 2009).

La salmonelosis equina ha sido reconocida como una causa infecciosa importante de colitis en caballos adultos (Bryans *et al.*, 1961; Smith, 1981) pero puede causar diarrea en caballos de cualquier edad (Mallicote *et al.*, 2012).

Las etiologías infecciosas de diarrea aguda son de notable preocupación ya que son una amenaza para una extensa propagación en hospital (Rikihisa *et al.*, 1990). Por lo tanto, el reconocimiento temprano de los signos clínicos y la iniciación de la terapia es esencial para un desenlace positivo, ya que la tasa de fatalidad para caballos hospitalizados que desarrollan diarrea aguda oscila del 25 al 42% (Buechner 1989; Cohen y Woods, 1999).

3.3.2.2. Enterocolitis clostridiana

La enterocolitis por *Clostridium difficile* es una inflamación del colon causada por sobrecrecimiento de las cepas toxigénicas de *C. difficile*, causando más comúnmente diarrea y variando los grados de toxemia (Fekety y Shah, 1993; Baverud y Franklin, 1998; Donaldson y Palmer, 1999; Weese *et al.*, 2001). La proliferación del este organismo ocurre cuando hay una alteración en la flora normal del colon (Songer, 1996; Arroyo *et al.*, 2004).

Clostridium difficile es un bacilo obligado anaerobio formador de esporas gram-positivo. Como *Salmonella*, la transmisión del organismo ocurre por la ruta oral-fecal; sin embargo, la infección por *C. difficile* puede ocurrir por ingestión ya sea del organismo vegetativo o de las endosporas resistentes. Como anaerobio obligado, la forma vegetativa de la bacteria no sobrevive bien bajo condiciones aeróbicas; sin embargo, las endosporas son capaces de sobrevivir bajo condiciones ambientales adversas en suelo y agua. Un estudio examinó la presencia de esporas de *C. difficile* en un hospital veterinario y se aisló el organismo de los establos, pisos, equipo médico y el calzado del personal médico (Weese, 2000). El organismo es más frecuentemente identificado en muestras de suelo de los criaderos de caballos (11%) que de granjas solamente con caballos maduros (1%) (Baverud *et al.*, 2003). El mismo estudio detectó *C. difficile* en las heces de caballos y potros sanos,

sugiriendo que los potros sanos pueden servir como potencial reservorio del organismo (Baverud *et al.*, 2003).

La producción de toxinas es un componente importante en la virulencia de *C. difficile*. Se han identificado por lo menos cinco toxinas, de las cuales la toxina A y B son las más estudiadas y más claramente entendidas. La toxina A es una efectiva enterotoxina la cual es capaz de causar acumulación de fluido intestinal e iniciar inflamación, mientras que la toxina B es una potente citotoxina (Lyerly *et al.*, 1982). Los genes de las toxinas A y B son identificados en la mayoría de los aislamientos de *C. difficile* de los caballos con enfermedad entérica aguda (Magdesian *et al.*, 2006). Un cultivo positivo de *C. difficile* en heces no es necesariamente diagnóstico, porque hay cepas toxina-positivas y cepas toxina-negativas de este organismo presente (Weese *et al.*, 2000; Arroyo *et al.*, 2004). Es necesaria la detección de toxinas clostridianas en heces mediante inmunoensayos o ensayos de citotoxicidad (toxina B) para establecer una diarrea asociada a *C. difficile* (Baverud, 2004).

En personas, está bien establecida una fuerte relación entre *C. difficile* y una diarrea asociada con antimicrobianos (Barbut y Petit, 2001) y en años recientes esta asociación ha sido probada en caballos (Magdesian *et al.*, 1993-1997; Baverud *et al.*, 1997; Arroyo *et al.*, 2004; Gustafsson *et al.*, 2004; Weese *et al.*, 2004). Los cambios inducidos por antimicrobianos en la microflora intestinal pueden tener un papel permisivo en el establecimiento o proliferación de *C. difficile*; sin embargo, son reconocidos casos de diarrea asociada a *C. difficile* que no están relacionados con una terapia con antibióticos. Varios antibióticos que han sido implicados en el desarrollo de diarrea asociada con *C. difficile* incluyen los antibióticos β -lactámicos (Baverud *et al.*, 1997; Magdesian *et al.*, 2002; Gustafsson *et al.*, 2004), eritromicina (Gustafsson *et al.*, 1997; Baverud *et al.*, 1998), gentamicina (Magdesian *et al.*, 2002) y sulfonamidas potenciadas (Baverud *et al.*, 1997; Magdesian *et al.*, 2002). En un modelo experimental, la enterocolitis por *C. difficile* fue inducida en potros de pony por inoculación ya sea con endosporas o células bacterianas vegetativas. Un factor importante en la inducción de la diarrea asociada con *C. difficile* con

endosporas en estos potros fue la interrupción de la flora gastrointestinal normal con la administración de clindamicina (Arroyo *et al.*, 2004). Esto muy probablemente imita la enfermedad adquirida naturalmente porque las endosporas son más persistentes en el ambiente que las células vegetativas. Estudios recientes han demostrado que el *C. difficile* obtenido de caballos con diarrea asociada a antibióticos mostraron un acoplamiento preferencial a las células intestinales equinas contra las células intestinales humanas *in vitro* (Taha *et al.*, 2007), sugiriendo que puede existir una dependencia y preferencia de la especie huésped.

El desarrollo de la diarrea asociada con *C. difficile* en caballos hospitalizados ha sido examinado en la literatura. No hay una diferencia significativa en el desarrollo de una diarrea nosocomial y la identificación de *C. difficile* en un estudio prospectivo en 81 caballos (Scantlebury *et al.*, 2008). Se desarrolló un brote de diarrea asociada a *C. difficile* en nueve caballos hospitalizados en dos días en otro reporte (Madewell *et al.*, 1995). A pesar de que se determinó que varias cepas diferentes de *C. difficile* fueron responsables del desarrollo de la diarrea, un grupo de casos merece atención. Los factores de riesgo para la diarrea asociada a *C. difficile* son similares a aquellos discutidos para la salmonelosis (ej. antimicrobianos, cambios de dieta, cirugía) y están muy probablemente relacionados con factores que alteran la microflora cecocólica y permiten la colonización, proliferación y producción de toxinas. La mayoría de estas asociaciones son anecdóticas y se necesitan más estudios para expandir nuestro entendimiento de la infección nosocomial clostridial (Chapman, 2009).

Divers (2002) ha sugerido que la distensión timpánica es más común en caballos con diarrea por *C. difficile* que en caballos con otras enfermedades diarreicas infecciosas; sin embargo, esto no ha sido demostrado objetivamente. Ahora, si las heces son toxina-positivas, un curso con metronidazol oral a una tasa de 15-25 mg/kg administrados cada 8 horas está indicado hasta que las heces sean toxina-negativas y se hayan vuelto firmes (McGorum *et al.*, 1998).

3.3.2.3. Enteritis parasitarias

Los parásitos más comúnmente implicados que pueden resultar en enterocolitis aguda o crónica en caballos son *Strongylus*. Las infecciones por estróngilos son causadas por dos grupos de nemátodos: grandes (strongilosis) y pequeños (ciatostomiasis) estróngilos. Aunque las infecciones por grandes estróngilos fueron identificadas como una causa importante de cólico, y ocasionalmente diarrea crónica, en caballos antes del desarrollo de los antihelmínticos modernos, los pequeños estróngilos han emergido en años más recientes como causa mayor de diarrea aguda y crónica, así como han estado implicados como causa de cólico (Feary y Hassel, 2006).

Actualmente se cree que los ciatostomas son la causa más comúnmente identificada de diarrea crónica en el caballo y también pueden estar asociados con una aguda y potencialmente fatal colitis (Jones, 2004). Paradójicamente, un riesgo asociado con el desarrollo de ciatostomiasis larvaria aguda es el tratamiento reciente con antihelmínticos adulticidas. Otros factores de riesgo para la ciatostomiasis clínica son la edad del caballo, con caballos entre 1 a 6 años más comúnmente afectados, y ocurrencia estacional (Reid *et al.*, 1995).

3.4. Diarrea en los potros

La diarrea se encuentra en las quejas clínicas más comunes en potros (Mallicote *et al.*, 2012). La diarrea del “calor del potro” es por sí misma un nombre incorrecto para los periodos cortos de diarrea vistos entre una y 2 semanas de edad en potros sistémicamente sanos (Johnston *et al.*, 1970). Esta forma de diarrea ocurre sin signos de enfermedad sistémica o inflamación y usualmente no es severa. Los potros permanecen brillantes y alertas, mantienen una hematología y resultados de laboratorio normales, y continúan mamando. Estos potros no requieren terapia, aunque deben ser monitoreados atentamente porque las formas tempranas de una enteritis pueden imitar la diarrea del calor del potro. Cualquier signo de enfermedad sistémica, incluyendo depresión o apetito reducido deberían justificar una investigación

cercana de ese neonato (Magdesian, 2005). Un síndrome de enterocolitis necrotizante es reconocido en el prematuro y neonatos a término en humanos y reportado en potros. En potros (aunque no en infantes), el síndrome se ha relacionado indefinidamente a infección clostridiana (Bueschel *et al.*, 1998; East *et al.*, 1998).

La diarrea es una causa significativa de morbilidad y mortalidad en el potro neonato (Cohen, 1994). La consistencia fecal alterada en el potro puede ser la manifestación de una simple diarrea o una enteritis, en donde en la última está asociada con un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (Magdesian, 2005).

Otras posibles causas de diarrea en el potro incluyen la ulceración gastroduodenal, enterocolitis mecánica, causas nutricionales o dietarias, enteritis clostridiana por *C. difficile* y *C. perfringens*, *Salmonella* (como *S. typhimurium*), y rotavirus (siendo la causa viral más común de diarrea neonatal).

3.5. Consideraciones terapéuticas en casos de diarrea aguda

Un examen físico exhaustivo proporciona los medios más fáciles y menos costosos para detectar los déficits de volumen y perfusión, recordando que las anomalías clínicas generalmente son indetectables hasta que el grado de deshidratación alcanza más del 5%. Los indicadores físicamente detectables de hipovolemia incluyen los siguientes: (1) taquicardia, (2) membranas mucosas pálidas, (3) tiempo de llenado capilar retardado, (4) mentalidad aburrida, (5) extremidades frías, (6) pulso periférico de calidad pobre, (7) llenado yugular prolongado, y (8) producción de orina reducido. Los indicadores físicamente detectables de hipoperfusión incluyen los siguientes: (1) membranas mucosas secas, (2) ojos hundidos (especialmente en potros), (3) producción reducida de película lagrimal, y (4) turgor de la piel reducido comparado con el normal (Macintire *et al.*, 2005).

Los principios generales para tratar al paciente equino con diarrea son los mismos, independientemente de la causa subyacente, y pretenden:

1. Restablecer la perfusión periférica reemplazando los déficits de fluidos y electrolitos;
2. Combatir la inflamación sistémica;
3. Reducir la inflamación intestinal;
4. Promover la reparación de la mucosa;
5. Restablecer la microflora intestinal normal (Naylor y Dunkel, 2009).

Debido a que los resultados netos de cualquier caso de diarrea aguda severa son pérdidas masivas de fluidos, electrolitos y proteína con signos secundarios, como hipovolemia, acidemia y choque cardiovascular y endotóxico, el objetivo principal del tratamiento es restablecer la homeostasis con tratamiento de soporte. Basados en las alteraciones de la homeostasis descritas previamente, los objetivos del tratamiento de colitis, sin importar la causa, pueden involucrar remplazo de fluidos y electrolitos, corrigiendo los desajustes ácido-base, soporte circulatorio, tratamiento de la hipoproteïnemia, control de la inflamación, control de las endotoxinas, manejo del dolor, protección y reparación de la mucosa, y el uso de antibióticos y anticoagulantes (Oliver y Stampfli, 2006).

3.5.1. Reemplazar pérdida de fluidos y electrolitos

Para corregir la pérdida de fluidos, la cantidad de fluidos requerida para ser reemplazada es calculada con la fórmula: $PC \times \% DH$, donde PC es peso corporal y DH es deshidratación. La cantidad calculada es administrada a una velocidad basada en el estatus cardiovascular. La velocidad usada puede ser entre 10 y 40 ml/kg/h. El uso de una solución salina hipertónica al 7.5% (5-7 ml/kg en 20 minutos) es una maniobra de resucitación para revertir la hipovolemia; sin embargo, en casos de colitis con hiponatremia severa, se debe administrar con precaución (Sterns *et al.*, 1994). Siempre necesita ser seguida por la administración de

soluciones isotónicas, con la cantidad comparada con la pérdida de fluido total más el requerimiento de mantenimiento diario calculado (Seahorn y Seahorn, 2003).

El bicarbonato de sodio es usado para tratar acidosis metabólica severa que no se corrige con la expansión del volumen (Oliver y Stampfli, 2006). También se pueden administrar agentes inotrópicos para incrementar la presión sanguínea sistémica cuando ésta cae marcadamente. El clorhidrato de dopamina, 1 a 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, es dado mediante la administración intravenosa continua (Oliver y Stampfli, 2006).

La dobutamina, 2 a 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, es dada mediante administración intravenosa continua (Hosgood, 1990).

3.5.2. Controlar la inflamación sistémica

El síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS por sus siglas en inglés) ocurre secundario a un insulto infeccioso o no infeccioso capaz de incitar a una inflamación sistémica severa. Esto puede surgir secundario a una lesión por quemadura, trauma o productos bacterianos, incluyendo LPS, los cuales son absorbidos a través de la pared intestinal hacia la circulación sistémica y provocar una respuesta inmune exagerada y descontrolada (Sykes y Furr, 2005).

Los AINES (ej. meglumine de flunixin, ketoprofeno, fenilbutazona, aspirina) son usados frecuentemente para atenuar la cascada inflamatoria. El meglumine de flunixin parece tener los efectos antiendotóxicos más potentes a una tasa de 1.1 mg/kg administrados cada 8 a 12 horas o a 0.25 mg/kg cada 6 a 8 horas; ó el ketoprofeno puede ser administrado a una tasa de 0.5 mg/kg cada 6 horas. La aspirina también previene la formación de trombos. Los AINES inhiben las prostaglandinas vasodilatadoras; por ello, se debe tener cuidado con respecto al daño renal (Moses y Bertone, 2002).

La DTO-esmectita es un silicato aluminomagnésico hidratado natural que está disponible comercialmente para el uso en caballos. Se ha demostrado que la DTO-esmectita adsorbe efectivamente sustancias, como endotoxinas y exotoxinas, en el tracto gastrointestinal humano, y más recientemente, que se une a las toxinas A y B del *C. difficile* de origen equino así como a la enterotoxina del *C. perfringens in vitro* sin ningún efecto en el crecimiento bacteriano o la acción del metronidazol (Weese *et al.*, 2003). El tratamiento con DTO-esmectita parece tener pocos o ningún efecto adverso en caballos maduros y potros, y reportes anecdóticos sugieren que es efectivo reduciendo el volumen y duración de la diarrea aguda en caballos (Feary y Hassel, 2006).

Los antisueros hiperinmunes o plasma son usados en la endotoxemia. Diferentes bacterias gram-negativas comparten centros antigénicos en común; por lo tanto, los anticuerpos tienen como objetivo el centro de los LPS (Spier *et al.*, 1989). Estos anticuerpos pueden promover la opsonización y aclaramiento reticuloendotelial e inhibir las interacciones de los LPS. Sin embargo, algunos estudios han fallado en mostrar resultados positivos (Morris *et al.*, 1986).

El uso de antibióticos en el tratamiento de la enterocolitis aguda es controversial (Papich, 2003). Aunque la siembra bacteriana a los otros órganos es rara, en pacientes severamente neutropénicos, el uso de antibióticos de amplio espectro parece estar indicado. Los antibióticos orales usados como tratamiento adyuvante en el cuidado de soporte son metronidazol (15-25 mg/kg administrado cada 8 horas) en casos de colitis asociada a toxinas de *C. difficile* y bacitracina de zinc (10 mg/kg administrado cada 12 horas) en colitis aguda por *C. difficile* toxina-negativa con un diagnóstico abierto para la causa de la diarrea (Stämpfli *et al.*, 1992; McGorum *et al.*, 1998). Normalmente se debería ver mejoría dentro de 2 ó 3 días. El metronidazol es potencialmente teratogénico y no debe ser usado en yeguas gestantes (Oliver y Stampfli, 2006).

En casos de *Salmonella* hay diferentes opiniones con respecto al uso de antibióticos en caballos adultos. Sin embargo, los potros septicémicos con salmonelosis son tratados rutinariamente con agentes antimicrobianos. Existen razones para usar antibióticos (pueden matar una *Salmonella* existente, pueden prevenir la propagación de la *Salmonella* en el tracto gastrointestinal hacia otros órganos, y pueden prevenir la propagación de bacterias entéricas a través de la mucosa intestinal dañada hacia otros órganos), pero también hay razones para no usarlos (probablemente no maten a la *Salmonella* existente, matar bacterias gram-negativas puede liberar LPS adicionales hacia el sistema, pueden prolongar la eliminación fecal de *Salmonella*, pueden contribuir a la resistencia a los antibióticos y pueden favorecer la alteración de la flora colónica). Los antimicrobianos usados en el tratamiento de salmonelosis incluyen la combinación de penicilina y gentamicina, la combinación de ceftiofur y gentamicina, y fluoroquinolonas (ej. enrofloxacin, orbifloxicina) (Murray, 2002).

Así como en humanos, el metronidazol ha sido considerado la primera línea de tratamiento para la colitis causada por *C. difficile* en caballos (Weese *et al.*, 2001; Magdesian *et al.*, 1993-1997). Se han reportado cepas resistentes al metronidazol por arriba del 43% en los aislamientos de caballos en ciertas regiones geográficas (Magdesian *et al.*, 1993-1997; Jang *et al.*, 1997). La terapia con metronidazol solo o en combinación con penicilina está recomendada, así el riesgo de una colitis inducida por antimicrobianos es mucho mayor en caballos adultos; es por eso, que estos medicamentos deben ser usados cuidadosamente (Lawson y Gebhart, 2000).

3.5.3. Reducir la inflamación intestinal y secreción de fluidos

Subsalicilato de bismuto

Se ha sugerido que el Subsalicilato de Bismuto disminuye la inflamación y secreción en el colon mayor y puede entonces ser benéfico en el tratamiento de la diarrea equina (Feary y Hassel, 2006). Se piensa que el bismuto cubre la mucosa mientras que el salicilato puede tener efectos antiprostaglandínicos aunque no existe evidencia *in vitro* disponible (Soriano-

Brucher *et al.*, 1991; Chowdhury *et al.*, 2001). Extrapolando las dosis de la medicina humana, se requieren grandes volúmenes, arriba de un litro, en el paciente equino adulto (Clark *et al.*, 1996; Lawler *et al.*, 2008).

3.5.4. Promover la reparación de la mucosa

El sucralfato (un complejo disacárido (sucrosa) sulfato-aluminio) ha sido usado para la protección y tratamiento de la ulceración gástrica debido a sus efectos citoprotectores y su capacidad para incrementar la biodisponibilidad de diversos factores de crecimiento. (Konturek *et al.*, 1991).

3.5.5. Restablecer la microflora intestinal normal

Los probióticos son ingredientes alimenticios no digeribles que afectan benéficamente al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon, y así mejorar la salud del huésped (Chouraqui *et al.*, 2008).

Durante la fase aguda, estos animales demuestran un catabolismo pronunciado y una pérdida rápida de la condición. Los pacientes leucopénicos e hipoproteinémicos se benefician del suero hiperinmune y/o transfusiones de plasma así como de los antibióticos parenterales de amplio espectro para prevenir la siembra de infecciones periféricas. El requerimiento de energía de un caballo de 500 kg en descanso en un estado normal es de 33 kcal/kg/día; un caballo con colitis aguda severa necesita aproximadamente 50 kcal/kg/día. Para contrarrestar el catabolismo severo con colitis aguda, también se ha reportado una nutrición parenteral parcial. Se ha usado un régimen: dextrosa 50% (2 L) es combinada con aminoácidos 8.5% (1.5 L) y LRS (1.5 L). Esto rinde como solución hipertónica; es por esto, que la infusión intravenosa parenteral tiene que evolucionar lentamente sobre el tiempo y debe ser iniciada en 140 ml/h e incrementar gradualmente a 280 ml/h y después a 560 ml/h. Este enfoque de

tratamiento ha reducido la cantidad de plasma usado, reducido la mortalidad, acortado el tiempo de hospitalización y reducido la factura total (Oliver y Stampfli, 2006).

3.5.6. Reducción de la inflamación

El tratamiento anti-inflamatorio enteral en el caballo está dirigido a limitar la absorción de endotoxinas y exotoxinas, así como a interrumpir las vías inflamatorias. Ambos, el caolín/pectina y el Subsalicilato de Bismuto han sido usados como agentes protectores/adsorbtivos; sin embargo, están faltando los estudios de eficacia sustanciando estas propiedades. Se cree que el Subsalicilato de Bismuto es desglosado en el intestino delgado en carbonato de bismuto y salicilato (Plumb, 1995). El bismuto es pobremente absorbido y el probable responsable de recubrir la mucosa, mientras que el salicilato parece ser absorbido en humanos y puede tener alguna actividad antiprostaglandínica (Plumb, 1995). Es por esta razón que el Subsalicilato de Bismuto es preferido anecdóticamente sobre el caolín/pectina, el cual puede ofrecer solamente algún grado de recubrimiento de la mucosa. El salicilato es excretado vía renal; así, debe ser usado con precaución en caballos con función renal dañada. Las dosis oscilan de 0.5 a 4 mL/kg cada 4 a 6 horas. Usando la dosis más baja, un caballo adulto requeriría aproximadamente 250 mL cada 4 a 6 horas. Se debe tener cuidado cuando se mezcla el Subsalicilato de Bismuto con otras fármacos, porque hay un potencial para inactivar otras drogas; sin embargo, los estudios de interacción no están disponibles. Las heces se vuelven negras grisáceas con el uso del Subsalicilato de Bismuto. Esto no debe ser confundido con melena (Tillotson y Traub-Dargatz, 2003).

En relación al pronóstico de los casos con colitis aguda, hay números limitados de estudios en la literatura. En un estudio retrospectivo en un hospital de enseñanza veterinaria, la tasa de casos de fatalidad fue de 42% (Staempfli *et al.*, 1991), aunque en un estudio más reciente, la tasa de casos de fatalidad fue de 25.4% (Papich, 2003). Los caballos que estaban severamente deshidratados tenían siete veces más probabilidades de morir (Murray, 2002), y

los caballos con antecedentes de administración de antimicrobianos por un problema previo a la diarrea tuvieron 4.5 veces más probabilidades de no sobrevivir (Cohen y Woods, 1999).

4. Subsalicilato de Bismuto

El Subsalicilato de Bismuto tiene la fórmula química empírica de $C_7H_5BiO_4$ (Figura 2). La estructura actual es desconocida y la fórmula solo es aproximada.

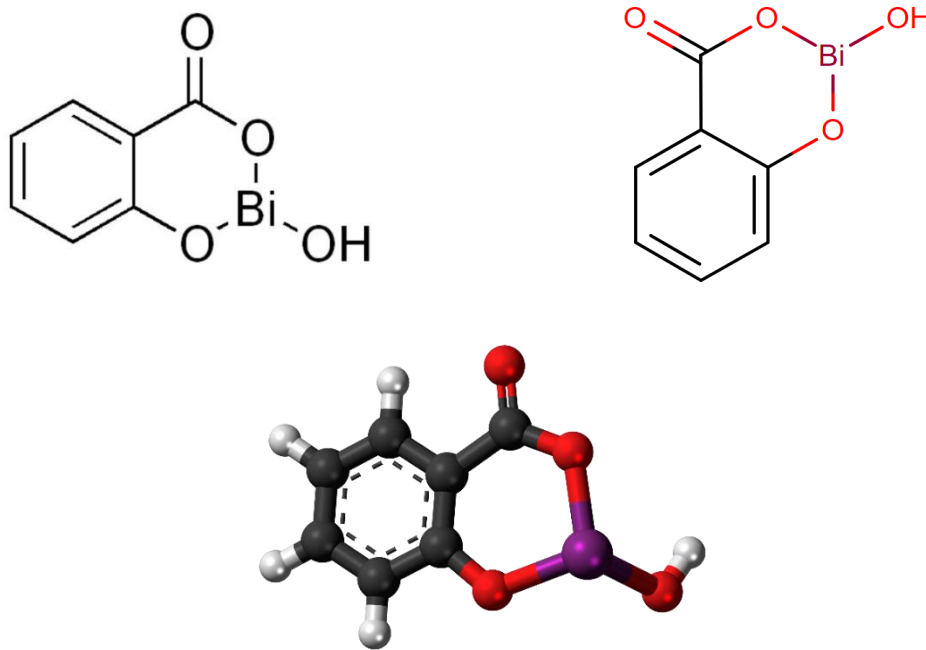


Figura 2. Estructura química del Subsalicilato de Bismuto.

El Subsalicilato de Bismuto se presenta como un polvo blanco o casi blanco, insaboro, inoloro y contiene alrededor de 58% de bismuto. Es insoluble en agua, glicerina y alcohol. También puede ser conocido como SSB, salicilato de bismuto básico, oxisalicilato de bismuto, salicilato de bismuto entre otros (Plumb, 2008).

En medicina veterinaria, los productos con SSB son usados para tratar diarrea y como

componente de la “triple terapia” para tratar infecciones gastrointestinales causadas por *Helicobacter*. El fármaco también es usado en humanos para otros síntomas gastrointestinales (indigestión, cólico, dolor por timpanismo) y en el tratamiento y profilaxis de la diarrea del viajero (Plumb, 2008).

Se cree que posee propiedades protectoras, anti-endotóxicas y de debilitamiento bacteriano. Se cree que el compuesto original es dividido en el intestino delgado en carbonato de bismuto y salicilatos (Plumb, 2008).

Se piensa que las propiedades protectoras, anti-endotóxicas y de debilitamiento bacteriano se deben al bismuto. El compuesto salicilato tiene una actividad antiprostaglandínica que puede contribuir a su efectividad y reduce los signos clínicos asociados con diarreas secretoras (Plumb, 2008).

En cuanto a su farmacocinética, no hay información veterinaria específica. En humanos, la cantidad de bismuto es insignificante mientras que el componente salicilatos es absorbido rápida y completamente. Los salicilatos se unen fuertemente a las proteínas plasmáticas y son metabolizadas en el hígado en ácido salicílico. El ácido salicílico, metabolitos salicilatos conjugados y cualquier bismuto absorbido son todos excretados vía renal (Plumb, 2008).

Debido a que puede ocurrir la absorción de salicilatos, se debe usar con precaución en pacientes con trastornos de la coagulación preexistentes (Plumb, 2008).

El bismuto es radiopaco por lo que puede interferir en exámenes radiológicos del TGI (Plumb, 2008).

Los productos antidiarreicos no son substitutos de una terapia de fluidos y electrolitos adecuada cuando ésta es requerida. Puede cambiar el color de las heces a gris-negrusco o

negro-verdoso; no confundir con melena (Plumb, 2008).

4.1. Empleo farmacéutico

Las preparaciones de bismuto han sido usadas en el tratamiento de un número de enfermedades gastrointestinales (Raedsch, 1991). Un número de diferentes preparaciones basadas en bismuto están disponibles, como el Subsalicilato de Bismuto, que es comúnmente usado en Estados Unidos (Scarpignato y Pelosini, 1999), y el subnitrate de bismuto y el subcitrato de bismuto coloidal, los cuales son usados principalmente en Europa (de Boer, 1999; Tefera *et al.*, 1999). La revisión de diferentes estudios sugiere que la forma química, solubilidad y características de absorción de estas preparaciones de bismuto pueden diferir significativamente (Scarpignato y Pelosini, 1999), aunque no se han hecho comparaciones directas (Phillips *et al.*, 2000). Sorprendentemente, los índices de erradicación de *H. pylori* en diferentes continentes parece comparable con todos los regímenes basados en bismuto, independientemente de la forma física y química del bismuto (Scarpignato y Pelosini, 1999).

Hay una cantidad substancial de evidencia clínica de que el Subsalicilato de Bismuto es efectivo en el tratamiento de desórdenes de diarrea (DuPont *et al.*, 1977; DuPont *et al.*, 1987; Steffen *et al.*, 1988).

El Subsalicilato de Bismuto comúnmente es usado en la prevención de la diarrea del viajero y dispepsia (Coleman *et al.*, 1990). Los compuestos insolubles en agua como el Subsalicilato de Bismuto muestran una pobre absorción, mientras que compuestos solubles en agua como el subcitrato de bismuto son absorbidos en mayor medida. Estudios en humanos también han confirmado que el subcitrato de bismuto es absorbido en mayor medida comparado con otros compuestos como el nitrato de bismuto, el subsalicilato, galato y el aluminato (Dresow *et al.*, 1991).

DuPont *et al.* (1977) mostraron que el Subsalicilato de Bismuto redujo la frecuencia de

las heces no formadas, incrementó la consistencia de las heces, y disminuyó la frecuencia de náusea y calambres abdominales en estudiantes americanos residiendo en México. Steinhoff *et al.* (1980) encontró que el bismuto tiene un efecto benéfico cuando es dado para gastroenteritis viral debido al agente Norwalk. El virus Norwalk es la cepa prototipo en el género Norovirus (NoV) dentro de la familia *Caliciviridae* (Glass *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 1992; Jiang *et al.*, 1993). Los NoVs humanos son la causa más común de brotes y gastroenteritis esporádicas no bacterianas en Estados Unidos así como la causa de enfermedad significativa en los países en desarrollo (Fankhauser *et al.*, 1998; Mead *et al.*, 1999; Patel *et al.*, 2008). Las infecciones por NoVs constituyen un importante problema de salud, con un estimado de 23 millones de casos de gastroenteritis que ocurren anualmente en los Estados Unidos, causando 50,000 hospitalizaciones y 300 muertes (Mead *et al.*, 1999). Los síntomas incluyen vómito severo, diarrea acuosa, náusea, calambres abdominales, fiebre y malestar general (Glass *et al.*, 2009).

Soriano-Brücher *et al.* (1991) mostraron que el Subsalicilato de Bismuto en una dosis de 100 mg/kg por día disminuyó la duración y frecuencia de heces no formadas en niños con diarrea aguda, comparado con el placebo.

4.2. Mecanismo de acción

A pesar del extendido uso del Subsalicilato de Bismuto en el tratamiento de la diarrea, su mecanismo de acción no está completamente entendido. Alguna evidencia sugiere que tiene propiedades antisecretoras y antimicrobianas (Ericsson *et al.*, 1977; Ericsson *et al.*, 1990; Manhart, 1990). La literatura indica que los posibles mecanismos de acción son la prevención del acoplamiento de los microorganismos a la mucosa intestinal, un efecto antimicrobiano directo en la víscera, inactivación de enterotoxinas y un efecto antisecretor del salicilato presente en el medicamento (Figuroa-Quintanilla *et al.*, 1993). Graham *et al.* (1983) mostraron que los patógenos eran aislados menos frecuentemente en pacientes con diarrea que recibieron bismuto que en aquellos que recibieron placebo. Los investigadores raramente

recuperaron *E. coli* enterotoxigénica de las heces de voluntarios que ingirieron estos organismos y recibieron Subsalicilato de Bismuto profilácticamente, pero sí aislaron *E. coli* enterotoxigénica en casi 87% de los pacientes que fueron tratado con placebos. Estos hallazgos sugieren una interacción específica del bismuto con la bacteria. Además de sus efectos antibacterianos, el bismuto puede influenciar el curso de las infecciones virales entéricas. Se ha mostrado que inhibe la replicación *in vitro* de cuatro cepas de rotavirus en células de cultivo de tejidos y causar una reducción dosis-dependiente en el crecimiento de un número de virus entéricos (Ward *et al.*, 1985).

Se han propuesto una serie de posibles explicaciones sobre el mecanismo de acción del Subsalicilato de Bismuto, incluyendo (1) prevención del acoplamiento de organismos a la mucosa intestinal, (2) efectos antimicrobianos directos causando su muerte o una pérdida de virulencia, (3) inactivación de toxinas, (4) efectos anti-inflamatorios del componente salicilato del SSB debido a un efecto inhibitorio en la formación de prostaglandinas y (5) unión de los ácidos biliares que pueden contribuir a la diarrea (Gryboski *et al.*, 1985). Además, el SSB probablemente estimula la absorción de fluidos y electrolitos, adsorbe ácidos biliares y enterotoxinas (Farris *et al.*, 1976).

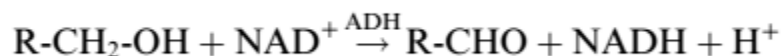
Para algunos compuestos de bismuto, se ha demostrado actividad antimicrobiana directa contra *H. pylori* (Scarpignato y Pelosini, 1999) y otros organismos entéricos (Graham *et al.*, 1983; Scarpignato y Pelosini, 1999), usando concentraciones de bismuto encontrados típicamente en el lumen gastrointestinal. El bismuto puede agregar la pared bacteriana y el espacio periplásmico (Lambert y Midolo, 1997) y varias acciones bactericidas del bismuto han sido implicadas, incluyendo la inhibición de la ureasa (Prewett *et al.*, 1992) y la síntesis de adenosintrifosfato (Lambert y Midolo, 1997). Además, distintos cambios morfológicos y una adhesión celular reducida (Lambert y Midolo, 1997; Scarpignato y Pelosini, 1999) de *H. pylori* han sido observados, ambos *in vitro* e *in vivo*, después de desafiar con subcitrato de bismuto coloidal o Subsalicilato de Bismuto; concentraciones mínimas inhibitorias de 8 a 64 µg/mL son comúnmente reportadas para estos agentes contra *H. pylori* (Scarpignato y

Pelosini, 1999). En contraste, se ha encontrado actividad no detectable del subnitrato de bismuto contra *H. pylori* (Whitehead *et al.*, 1993), a pesar de su probable eficacia *in vivo* (Graham *et al.*, 1989; Lerang *et al.*, 1989; Tefera *et al.*, 1999).

El bismuto puede alterar los mediadores inflamatorios de la mucosa, por ejemplo incrementando la prostaglandina E2 (Mertz-Nielsen *et al.*, 1991), inhibiendo la lipasa y fosfolipasa A₂ (Slomiany *et al.*, 1991) e incrementando los niveles de otros factores citoprotectores (Pugh y Lewin, 1990) que pueden promover la cicatrización de la úlcera, pero es poco probable que éstos influyan directamente en la erradicación de *H. pylori*. Un posible blanco para un efecto antibacteriano indirecto del bismuto es la capa mucosa adherente, ya que la mayoría de los metales divalentes y trivalentes —e incluso sus complejos particulados— interactúan fuertemente con el moco gastrointestinal (Whitehead *et al.*, 1996). En efecto, el bismuto incrementa la viscosidad del moco gastrointestinal y esto, por ejemplo, reduce la difusión de protones a través de la capa (Turner *et al.*, 1985).

Los compuestos de bismuto experimentan una precipitación en el tracto gastrointestinal para formar complejos extremadamente insolubles y pobremente absorbidos como el oxiclورو de bismuto y el sulfuro de bismuto (Gorbach, 1990).

La efectividad del bismuto ha sido atribuida a su acción bactericida contra *H. pylori*. Se piensa que la inhibición enzimática desempeña un papel importante en la acción de los medicamentos que contienen bismuto. El mecanismo por el cual el bismuto inhibe el crecimiento de *H. pylori* todavía no está bien comprendido. Se ha demostrado previamente que los medicamentos con bismuto pueden inhibir la alcohol deshidrogenasa citosólica (ADH) de *H. pylori* (Blaser, 1992; Roine *et al.*, 1992; Salaspuro, 1992). Las ADHs son metaloenzimas de zinc que catalizan la oxidación de los alcoholes en aldehídos o cetonas:



Donde NAD^+/NADH son coenzimas (NAD, nicotinamida adenina dinucleótido; NADH, nicotinamida adenina dinucleótido reducida).

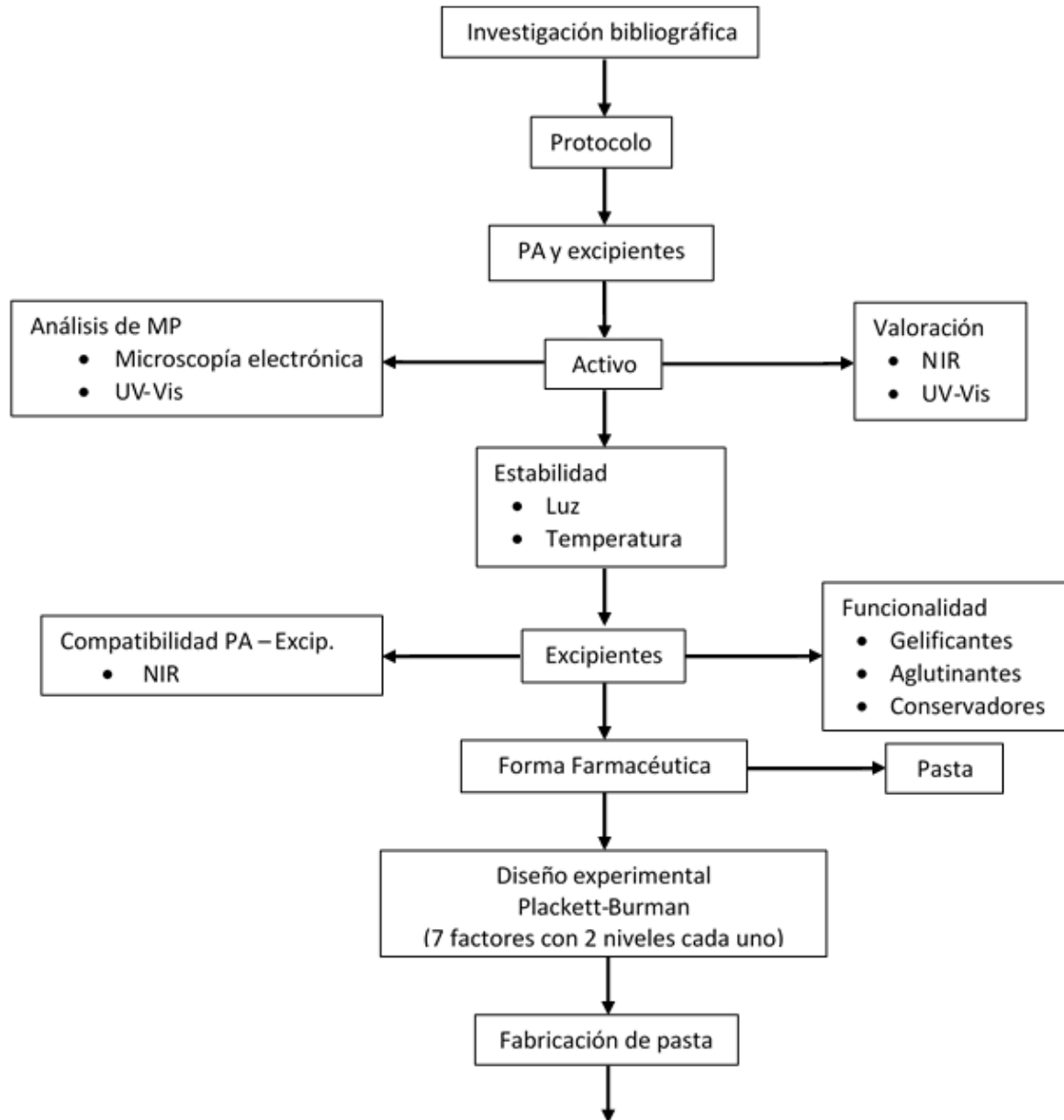
H. pylori contiene ADH citosólica la cual es capaz de producir acetaldehído, el cual puede formar aductos con fosfolípidos y proteínas, del etano exógeno y endógeno (Bode *et al.*, 1984; Kenney, 1982; Sorrell *et al.*, 1985). Los aductos acetaldehído-proteína pueden después inhibir la secreción de proteínas, desplazar el fosfato piridoxal de sus sitios de unión en proteínas o afectar algunas funciones biológicas de las enzimas (Lumeng, 1978; Matsuda *et al.*, 1979; Roine *et al.*, 1993). Los aductos acetaldehído-proteína pueden formarse en la mucosa gástrica y pueden interferir subsecuentemente con los factores de defensa de la mucosa que causa la morbilidad gastrointestinal. Se ha demostrado que la inhibición de la ADH por los medicamentos de bismuto suprime la producción de acetaldehído, el cual es tóxico para las células de la mucosa (Salaspuro. 1994).

El mecanismo antimicrobiano exacto no es conocido, pero se piensa que el bismuto se une a la bacteria, afectando la pared celular y el transporte transmembrana (Manhart, 1999; Sox y Olson, 1989).

La efectividad del SSB en pacientes con diarreas de diferente etiología sugiere un mecanismo de acción no específico propuesto por Ericsson *et al.* (1977). El rápido cambio en las características de las heces junto con la marcada reducción en los requerimientos de fluidos vistos en pacientes en el reporte de Soriano-Brücher *et al.* (1991) apoyaron esta hipótesis. Burke y Gracey (1980) demostraron que los salicilatos son capaces de antagonizar la secreción intestinal inducida por toxinas producidas por un amplio rango de organismos incluyendo *E. coli*, *Shigella* y *Salmonella*. El SSB es hidrolizado en ácido en el estómago en oxiclورو de bismuto y el componente salicilato es fácilmente absorbido y disponible sistémicamente (Pickering *et al.*, 1981).

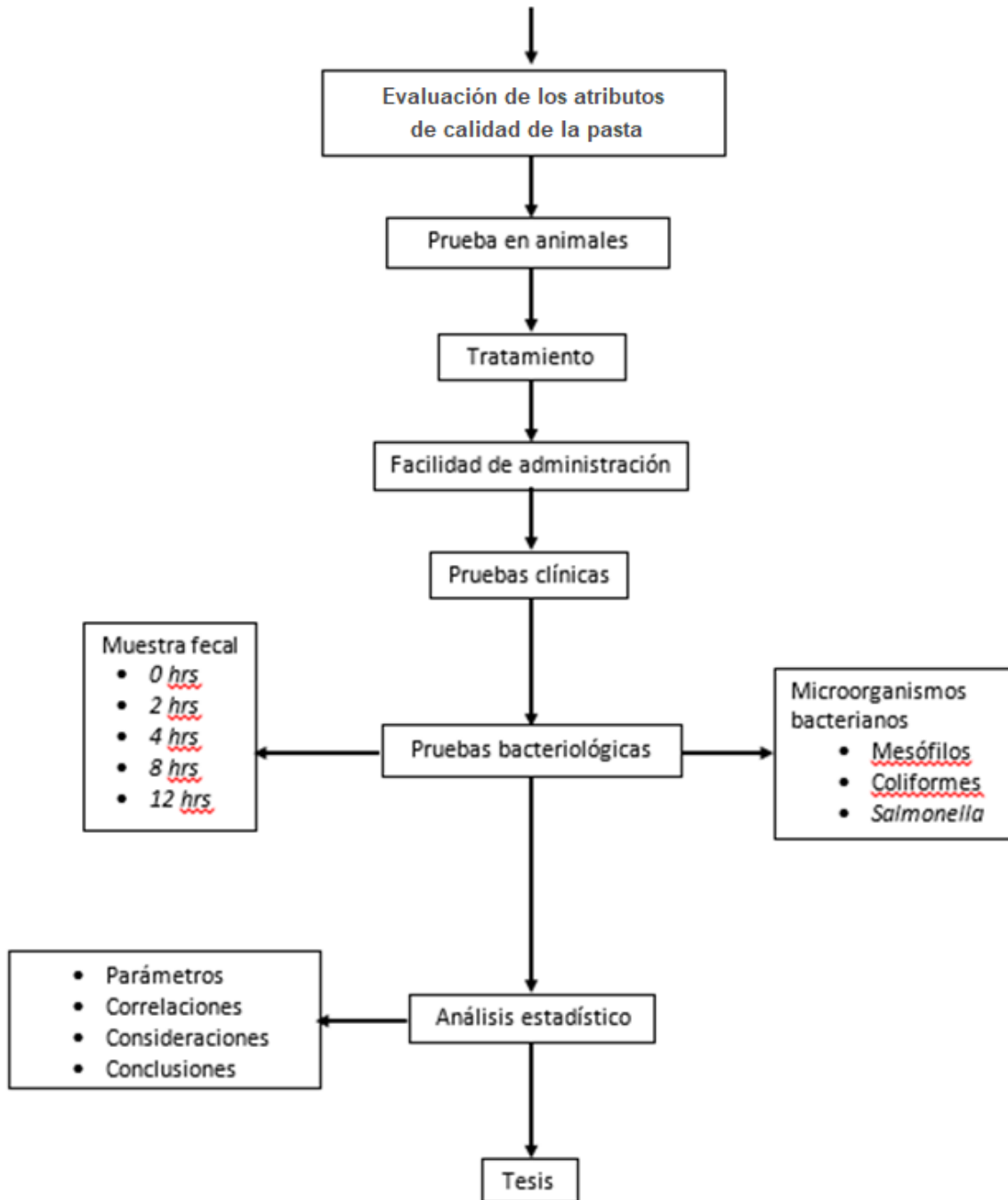
V. DESARROLLO EXPERIMENTAL

1. Cuadro Metodológico



Continúa...

Continuación...



2. Materiales y métodos

2.1. Localización

Los ensayos para la determinación de la densidad, velocidad de flujo y salicilatos se llevaron a cabo en el Laboratorio 5 de la UIM (LEDEFAR) de Campo 4 en la FES-Cuautitlán de la UNAM. Las pruebas bacteriológicas se realizaron en el Laboratorio de Diagnóstico Bacteriológico y Micológico Veterinarios del mismo campus, así como en el Laboratorio 14 de la UIM en la misma institución.

2.2. Animales

Se emplearon dos equinos clínicamente sanos pertenecientes al Hospital de Equinos de la FES-Cuautitlán UNAM, así como el caso de un equino que presentó diarrea ingresado al nosocomio. Los equinos clínicamente sanos siguieron las condiciones ambientales, de alimentación y estabulación a las que están acostumbrados.

2.3. Material de laboratorio

- 10 Recipientes de plástico con tapa
- Espátula
- Agitador de vidrio
- Picnómetro de acero inoxidable
- 40 Jeringas de 5 ml
- Guantes
- Matraz volumétrico aforado de 200 mL
- 2 soportes metálicos
- 4 barras metálicas
- Bolsas de plástico

- Vaso de precipitados de 200 mL
- Matraz volumétrico de 100 mL
- Matraz de 25 mL
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 25 mL
- Probeta de 10, 100 y 500 mL
- Matraz aforado de 10, 25, 100 y 250 mL
- Papel Whattman 540
- Matraz de 50 mL
- Matraz volumétrico de 20 mL
- 30 viales de vidrio para muestras del NIR
- Pastas desarrolladas a base de SSB
- Suspensión veterinaria comercial de SSB
- Sonda nasogástrica de desparasitación para equino adulto
- Embudo de plástico
- Vasos de precipitados de 50, 100, 500 y 1000 mL
- Puntas para micropipetas 1000 μ L, Finnpiptete
- 100 tubos de cultivo de polipropileno con tapa
- Barras magnéticas
- 35 Jeringas de 20 mL
- 7 Jeringas de 50 mL
- Tubos Vacutainer de 10 mL
- 1000 cajas de Petri estériles desechables
- Agar Verde Brillante
- Agar MacConkey
- Agar Cuenta Estándar
- Autoclave

Formulaciones

- 10 lotes a base de SSB

2.4. Equipo e instrumentos

- Balanza analítica Mettler Toledo Mod. AB- 204S
- Cronómetro Citizen Mod: AZ1200
- Micropipetas 1000 μ L Finnpipette
- pH metro Mettler Toledo mod: A165
- Agitador magnético Mettler Toledo
- Infra Rojo Cercano (NIR) FOSS Mod: NIR – 6500
- Espectrofotómetro Varian UV – Vis Mod: Cary 100 Conc
- Balanza granataria Mod: OHAUS
- Balanza digital 5000 g Mod: VE – 5000
- Estufa de calor seco (60°C)
- Lámpara de luz UV
- Ultracentrífuga

2.5. Reactivos y materias primas

2.5.1. Subsalicilato de Bismuto

El Subsalicilato de Bismuto ha sido ampliamente comercializado en Estados Unidos por más de 80 años. En el tracto gastrointestinal, el SSB es convertido en ácido salicílico y en sales insolubles de bismuto. La porción de salicilatos del SSB es extensamente absorbida (más del 90%) y excretada en orina. En humanos, la dosis diaria máxima (4.2 g de SSB) resulta en concentraciones máximas de salicilato en plasma considerablemente por debajo del nivel de toxicidad por salicilatos. En contraste, poco bismuto del SSB es absorbido del tracto gastrointestinal (menos del 0.005%) (Bierer, 1990).

El SSB se presenta como un polvo blanco o cercanamente blanco, insaboro, inodoro y contiene alrededor del 58% de bismuto. Es insoluble en agua, glicerina y alcohol. Puede ser conocido también como oxisalicilato de bismuto (Plumb, 2008).

2.5.2. Glicerina

La glicerina es usada en una amplia variedad de formulaciones farmacéuticas incluyendo preparaciones orales, óticas, oftálmicas y parenterales. La glicerina es usada en geles acuosos y no acuosos. La glicerina es higroscópica y también es propensa a la oxidación por la atmósfera bajo condiciones ordinarias de almacenamiento. Las mezclas de glicerina con agua, etanol (95%) y propilenglicol son químicamente estables (Rowe *et al.*, 2009).

2.5.3. Optiphen™ (Fenoxietanol y caprilil glicol)

Una fórmula única conservante líquida que consta de fenoxietanol y una base emoliente. La combinación de estos ingredientes proporciona una protección optimizada contra el crecimiento microbiano de bacterias y levaduras (Ashland, 2017).

2.5.4. Silicato de magnesio y aluminio

El complejo está compuesto por una capa tridimensional de aluminio octaédrico y dos hojas de sílice tetraédrica además de silicón, oxígeno y agua. El aluminio es substituido para variar los grados de magnesio (con sodio o potasio para el balance de las cargas eléctricas). Los elementos adicionales presentes en pequeñas cantidades incluyen hierro, litio, titanio, calcio y carbón. Funciona como adsorbente, agente estabilizante, agente suspensor y agente viscosante (Rowe *et al.*, 2009).

2.5.5. Raphitix™ A-60 (Poliacrilato de sodio, polideceno hidrogenado o trideceth-6)

El poliacrilato es un emulsificante común para obtener diferentes estructuras de emulsiones. Ha sido usado tanto como emulsificante; así como, modificador reológico. Engrosa rápidamente cuando se adiciona al agua y proporcionará resistencia a la deformación y viscosidad al sistema (Oguz y Sariisik, 2000).

2.5.6. Aerosil® (Dióxido de silicio)

El dióxido de silicio es una sílice ahumada submicroscópica con un tamaño de partícula de alrededor de 15 nm. Es un polvo ligero, suelto, color blanco azulado, inodoro, insaboro y amorfo. Es higroscópico pero absorbe grandes cantidades de agua sin licuarse. En un pH mayor a 7.5 las propiedades para aumentar la viscosidad se ven reducidas. El polvo de dióxido de silicio debe ser almacenado en un contenedor bien cerrado (Rowe *et al.*, 2009).

2.5.7. PEG 400 (Polietilenglicol 400)

Las soluciones acuosas de polietilenglicol se pueden usar como agentes suspensores o para ajustar la viscosidad y consistencia de otros vehículos suspensores. Cuando se utiliza junto con otros emulsionantes, los polietilenglicoles pueden actuar como estabilizadores de la emulsión (Rowe *et al.*, 2009).

2.5.8. Natrosol™ 250 HHX (Hidroxietilcelulosa)

La hidroxietil celulosa se presenta como un polvo higroscópico blanco amarillento o blanco grisáceo inodoro e insaboro. La hidroxietilcelulosa es un polímero no iónico, soluble en agua ampliamente utilizado en formulaciones farmacéuticas. Se utiliza principalmente como espesante en formulaciones oftálmicas y tópicas, aunque también se utiliza como aglutinante y agente de revestimiento de película para tabletas. Está presente en las preparaciones

lubricantes para ojo seco, para el cuidado de lentes de contacto y sequedad bucal. (Rowe *et al.*, 2009).

2.6. Diseño experimental

Se aplicó un diseño experimental Plackett-Burman con 7 factores cada uno con dos niveles (Tabla 1). El diseño se muestra en la Tabla 2.

Tabla 1. Niveles de los factores del diseño experimental.

Factores (unidades)	Código del factor	Niveles	
		-1	1
Agua (%)	X1	0	35
Glicerina (%)	X2	30	68.9
Silicato de magnesio y aluminio (%)	X3	0	10
Rapithix (%)	X4	0	3
Aerosil (%)	X5	0	4.5
Polietilenglicol 400 (%)	X6	0	1
Natrosol (%)	X7	0	1

Tabla 2. Diseño experimental para estudiar el efecto de los excipientes sobre las variables de respuesta implicadas en este estudio.

Código de Lote	Fórmula	Factores codificados						
		X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
P-GA-00	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
P-GA-05	2	1	-1	-1	1	-1	-1	-1
P-G-01	3	-1	1	1	-1	-1	-1	-1
P-G-05	4	-1	1	-1	1	-1	-1	-1
P-GA-04	5	1	-1	-1	-1	-1	-1	1
P-G-04	6	-1	1	-1	-1	-1	-1	1
P-GA-01	7	1	-1	1	-1	-1	-1	-1
P-GA-03	8	1	-1	-1	-1	1	1	-1
P-G-03	9	-1	1	-1	-1	1	1	-1
P-G-00	10	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1

Las variables de respuesta evaluadas fueron:

- Atributos de calidad
- Velocidad de Flujo
- Densidad

2.6.1. Atributos de calidad requeridos de la pasta

Dado que la administración es oral se establecieron previamente los atributos descritos en la Tabla 3 los cuales se consideraron para seleccionar la formulación óptima:

Tabla 3. Especificaciones de la pasta óptima.

Atributo de calidad	Especificación
Aspecto	Pasta cremosa uniforme sin grumos estable con respecto al tiempo
Velocidad de flujo	Que la pasta pueda administrarse por vía oral a través de una jeringa
Contenido de Subsalicilato de Bismuto por cada 100 g de pasta	30%
Estabilidad	Sin variación en su comportamiento espectral en infrarrojo

El 30% de Subsalicilato de Bismuto en la pasta se estableció porque en la suspensión comercial de Subsalicilato de Bismuto que se encuentra en el mercado mexicano tiene como especificación que por cada 100 mL de suspensión se tiene 1.75 g de Subsalicilato de Bismuto. Por lo tanto, si consideramos que la dosis a aplicar a un caballo adulto promedio (450 kg) sería de 500 ml de la suspensión comercial, el contenido de Subsalicilato de Bismuto

es de 8.75 g. Por lo tanto, esto se consideró para que en 30 g de pasta se tuvieran 9 g de Subsalicilato de Bismuto, cantidad muy cercana a la utilizada en la suspensión.

2.6.2. Velocidad de flujo

Se llenó una jeringa de 5 mL con una cantidad de pasta la cual fue desplazada por unas placas de acero de un peso determinado y se tomó el tiempo que tardó en ser desplazada la materia. La prueba se realizó por triplicado para cada lote cambiando de jeringa en cada repetición y se obtuvo la media para cada elemento de la siguiente fórmula:

$$\text{VelFlujo} = \frac{(P_2 - P_1) - (P_3 - P_4)}{t}$$

Donde P_1 es el peso del vaso de precipitados vacío al inicio de la prueba, P_2 es el del vaso de precipitados conteniendo la jeringa llena de la pasta de interés, P_3 es el peso de la jeringa vacía después de la prueba dentro del vaso de precipitados, P_4 es el peso del vaso de precipitados vacío al final de la prueba y t es el tiempo que tardó en desplazarse el contenido de la jeringa fuera de la misma.

2.6.3. Densidad.

La evaluación de la densidad se llevó a cabo con un picnómetro de acero inoxidable con el cual se comparó el peso del agua desionizada que ocupaba su volumen y el peso de cada pasta que ocupaba el mismo volumen del picnómetro. La prueba se realizó por triplicado para cada lote y se empleó la media de cada elemento en la siguiente fórmula:

$$P = \frac{(M_2 - M_1)}{(M_3 - M_1)}$$

Donde P es la densidad, M₁ es el peso del picnómetro vacío, M₂ es peso del picnómetro lleno de la muestra y M₃ es el peso del picnómetro lleno de agua desionizada.

2.6.4. Pruebas a realizar a la formulación óptima

Una vez que se seleccionó la pasta óptima en base a los criterios de aceptación establecidos previamente, se realizaron pruebas de estabilidad física con el espectro de infrarrojo cercano (NIR) y se estudió su efecto sobre la flora bacteriana de interés en heces de dos equinos clínicamente sanos y uno con diarrea (Figura 3).

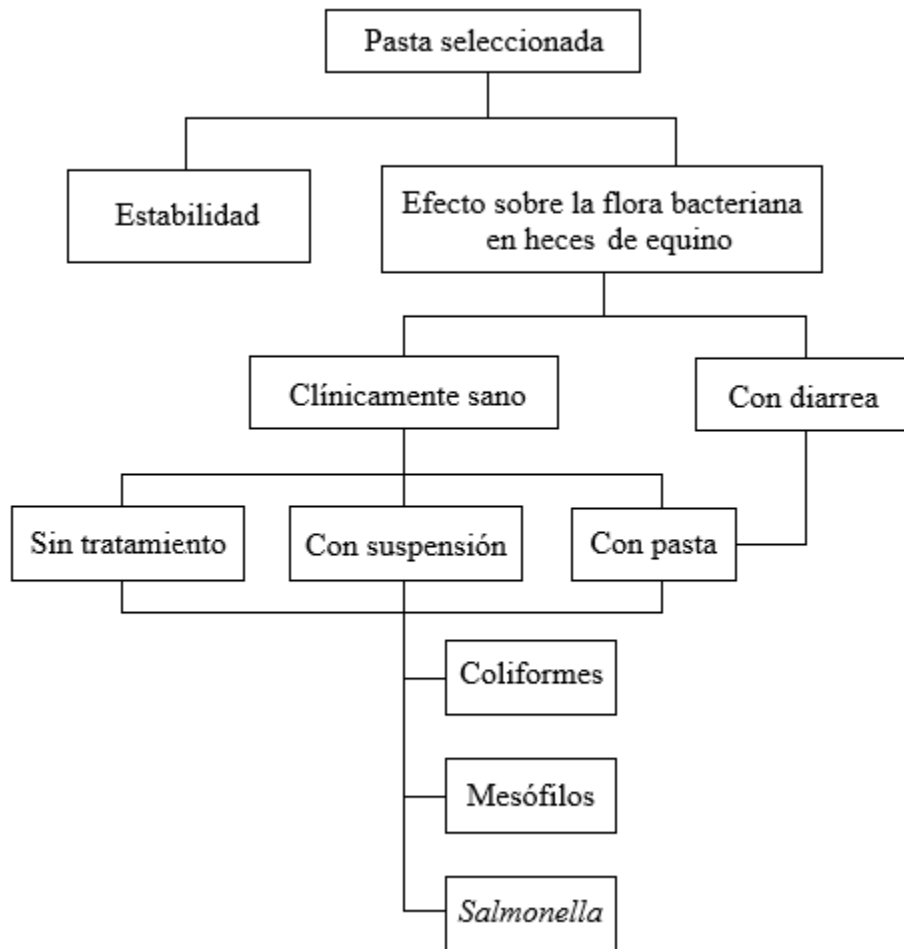


Figura 3. Diagrama de flujo de las pruebas realizadas a la pasta seleccionada como óptima.

2.6.4.1 Estabilidad física con el espectro de infrarrojo cercano

Empleando un equipo de infrarrojo cercano marca FOSS 6500, se determinó el espectro del Subsalicilato de Bismuto y de la formulación seleccionada como óptima (Fórmula 8 = Lote P-GA-03). Posteriormente esta fórmula se sometió a condiciones de estrés de luz UV y alta temperatura (60°C en estufa incubadora) y se leyó nuevamente el espectro a los 60 y los 160 días para determinar si hubo interacciones entre los componentes de la fórmula.



2.6.4.2. Efecto de la pasta sobre la flora bacteriana de interés en heces de equinos clínicamente sanos y con diarrea

Se obtuvieron muestras de heces de los equinos (Unidades Experimentales) clínicamente sanos, antes y después de la administración de la suspensión de Subsalicilato de Bismuto existente en el mercado. Las muestras se obtuvieron a las 0, 2, 4, 8 y 12 horas y se sembraron en medios de cultivo agar verde brillante, agar método estándar y agar MacConkey realizando diluciones exponenciales para el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de *Salmonella*, mesófilos y coliformes respectivamente. La lectura de las UFC se realizó a las 48 hrs. de incubación a 37°C.

Se dejaron descansar los equinos durante 1 mes y se realizó el mismo procedimiento administrando la pasta de Subsalicilato de Bismuto seleccionada como óptima (P-GA-03).

Para el equino que presentó el cuadro de diarrea, se obtuvo una muestra de heces previo a iniciar el tratamiento con la pasta de SSB seleccionada como óptima. Una vez obtenida dicha muestra, se inicio la administración de 4.5 g de SSB en pasta vía oral y se repitió la dosis cada 4 horas durante 48 hrs. Los muestreos de heces se realizaron a las 0, 2, 4, 8 y 12 hrs. Las muestras se sembraron en los mismos medios de cultivo y se siguieron las mismas condiciones de incubación y lectura.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Atributos de calidad requeridos de la pasta.

Después de un mes de haber fabricado las fórmulas, éstas fueron separadas y agrupadas. Se ordenaron de acuerdo a la denominación de la fórmula tomando en cuenta la presencia o ausencia de agua dentro de la misma así como el resto de los excipientes (Figura 4).

Se evaluó de manera visual y al momento de mezclar nuevamente la pasta con un agitador, si hubo separación entre el o los agentes humectantes y el resto de los componentes de cada formulación; así como cambios de color, textura o consistencia y si hubo contaminación por microorganismos principalmente de tipo fúngico (Tabla 4 y Figura 5).

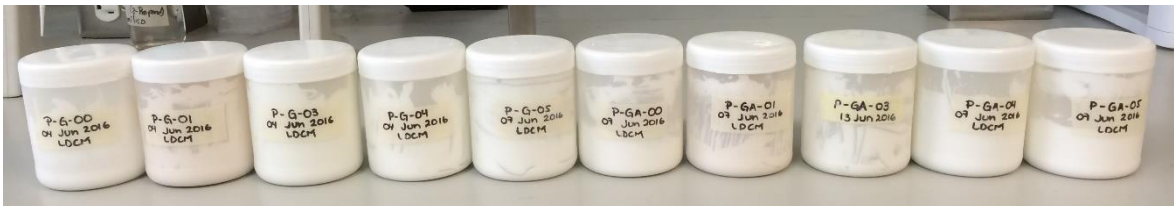


Figura 4. Agrupación de las diez diferentes formulaciones para la evaluación de los atributos de calidad de las pastas.

Tabla 4. Atributos observados en las pastas obtenidas a través del diseño experimental después de un mes de su fabricación.

Fórmula	Lote	Separación visible de elementos	Cambio de coloración	Consistencia	Contaminación por microorganismos	Observaciones al mezclar
1	P-GA-00	Si	No	Ligeramente seca	No	No
2	P-GA-05	Si	No	Muy seca	No	Suave al mezclar
3	P-G-01	No	Si	Lig. viscosa y altamente densa	No	No
4	P-G-05	No	No	Levemente pesada	No	Suave al mezclar
5	P-GA-04	No	No	Muy viscosa	No	Adherente
6	P-G-04	Si	No	Pesada	No	Pesada al mezclar
7	P-GA-01	No	Si	Dura, seca, arcillosa	No	No
8	P-GA-03	No	No	Muy suave	No	No
9	P-G-03	No	No	Ligeramente espesa	No	No
10	P-G-00	No	No	Viscosa	No	Sedimentación

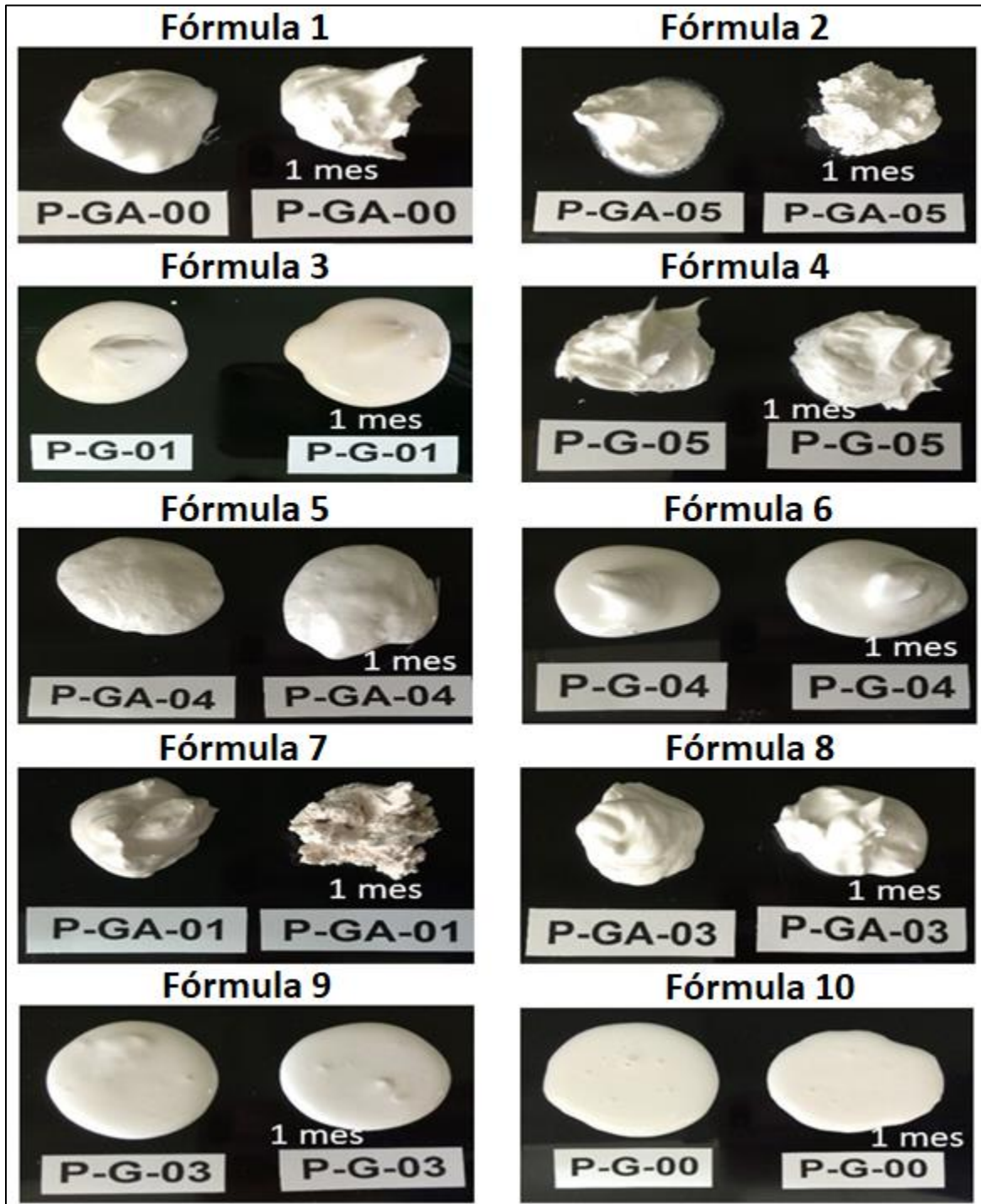


Figura 5. Aspecto de las pastas de las diez fórmulas del diseño experimental, recién elaboradas y a un mes de almacenamiento.

La forma farmacéutica elegida tiene un papel importante al momento de seleccionar el principio activo y los excipientes que formarán parte de aquella. Por lo anterior, en este trabajo fue esencial realizar una evaluación de la estabilidad física de los distintos lotes con el objetivo de seleccionar la pasta más adecuada. Además de que una alteración física es indeseable, en este caso fue esencial considerar que la pasta se administra a los equinos a través de una jeringa por vía oral; por lo tanto, si no hay estabilidad física, es decir que se muestra separación de sus componentes, no sería posible realizar alguna acción física para reincorporarlos y devolverle la homogeneidad. Otro indicador de la inestabilidad de las pastas es un cambio de coloración, la cual es probable que interfiera en los puntos importantes del medicamento como son la seguridad y eficacia.

Finalmente, fue importante la observación minuciosa para detectar o descartar un posible crecimiento de microorganismos principalmente de tipo fúngico.

De los diez lotes que se elaboraron, tres presentaron una separación de sus componentes que fue detectable a simple vista (fórmulas P-GA-00, P-GA-05, P-G-04). Por otro lado, las fórmulas P-G-01 y P-GA-01, que contienen silicato de magnesio y aluminio, presentaron un cambio de coloración del día de su fabricación al día en que se realizó la evaluación. Por su parte, la fórmula P-GA-04 presentó una consistencia muy viscosa con alta adherencia a las paredes y al agitador mientras que la fórmula P-G-00 mostró una sedimentación evidente de la fase sólida. Dichas características fueron consideradas al momento de realizar la selección de la fórmula óptima. Siguiendo la Tabla 4, las tres fórmulas restantes fueron las que no presentaron cambios en su aspecto (P-G-05, P-GA-03, P-G-03).

2. Resultados de las variables de respuesta del diseño experimental

En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos de las variables de respuesta de la velocidad de flujo y de la densidad de las pastas elaboradas en función del diseño experimental Plackett-Burman.

Tabla 5. Resultados de las variables de respuesta del diseño experimental Plackett-Burman con 7 factores.

Resultados del Diseño Experimental								
Código de Lote	Fórmula	Y ₁ = Velocidad de Flujo (g/s)*		Y ₂ = Densidad (g/mL)*		Y ₃ = Salicilatos (%)*		Y ₄ = Bismuto
		Media	s	Media	s	Media	s	(%)
P-GA-00	1	5.32	1.12	1.15	0.00	11.32	0.44	17.49
P-GA-05	2	11.95	1.14	1.46	0.02	12.14	0.49	17.48
P-G-01	3	0.78	0.06	1.51	0.01	11.86	1.03	17.49
P-G-05	4	0.20	0.05	1.49	0.01	12.45	1.38	17.49
P-GA-04	5	10.54	0.80	1.18	0.02	12.35	2.13	17.44
P-G-04	6	1.26	0.17	1.40	0.01	11.87	0.30	17.49
P-GA-01	7	0.04	0.00	1.47	0.02	12.07	0.77	17.47
P-GA-03	8	11.63	1.74	1.41	0.02	12.44	2.47	17.48
P-G-03	9	3.38	0.27	1.42	0.01	11.20	0.16	17.52
P-G-00	10	1.90	0.31	1.51	0.02	12.12	1.10	17.49

3. Velocidad de flujo de las pastas (Y₁)

El análisis de variancia de la velocidad de flujo de las diez fórmulas mostró diferencias significativas entre ellas ($p < 0.05$), como lo muestra la Tabla 6 y su comportamiento gráfico en la Figura 6; en donde se marca con un círculo rojo la fórmula P-GA-03 porque fue la que presentó mayor facilidad para dosificarla a través de una jeringa y no presentó problemas de estabilidad.

Tabla 6. Análisis de variancia que se aplicó para comparar la velocidad de flujo de las diez fórmulas del diseño experimental.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	641.25	9	71.25	111.01	0.0000
Intra grupos	12.84	20	0.64		
Total	654.09	29			

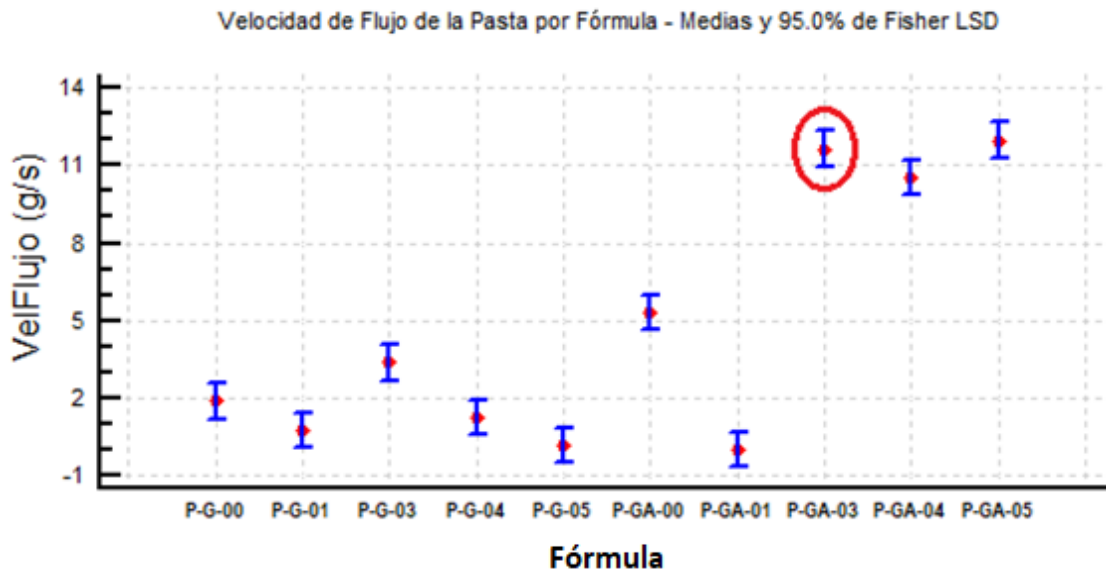


Figura 6. Comparación de las medias de las velocidades de flujo de las diez fórmulas del diseño experimental. Los intervalos mostrados están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con 95% de confianza. Se marcó con un círculo rojo la formulación óptima.

Para determinar el efecto de cada uno de los siete factores considerados en el diseño experimental sobre la variación de la velocidad de flujo de las pastas de Subsalicilato de Bismuto, se analizaron los resultados a través de modelos lineales generalizados con el programa de Statgraphics Centurion versión XV.

El modelo determinado para explicar la variación de la velocidad de flujo de las pastas de Subsalicilato de Bismuto (Y_1) fue:

$$Y_1 = 33 - 87X_1 - 107X_2 + 61X_3 - 2X_4 - 4X_5 - X_1X_3 - 2X_1X_4 - 6.9X_1X_5 + 120X_1X_2X_3$$

$$R^2 = 0.9804 \text{ con nivel de significancia de los coeficientes del modelo } p < 0.05$$

El modelo determinado nos permitió determinar que la variación de la velocidad de flujo de las pastas depende principalmente de la interacción entre el agua (X_1), la glicerina (X_2) y el silicato de aluminio y magnesio (X_3). Los coeficientes del modelo indican el peso de la influencia de los factores y su signo indica el tipo de relación entre los factores. En la Figura 7 se muestra el efecto que tiene de cada uno de los factores implicados en el modelo sobre la variación de la velocidad de flujo de las pastas de Subsalicilato de Bismuto. Se muestra que la interacción entre el agua (X_1), la glicerina (X_2) y el silicato de aluminio y magnesio son los que más influyen en la variación de la velocidad de flujo de las pastas con Subsalicilato de Bismuto. El agua y la glicerina tienen una relación inversamente proporcional con la velocidad de flujo de la pasta es decir cuando aumentan, la velocidad de flujo de la pasta disminuye; mientras que el silicato de aluminio y magnesio tiene una relación directamente proporcional, es decir, que cuando aumenta el silicato de aluminio y magnesio aumenta la velocidad de flujo de la pasta de Subsalicilato de Bismuto. Los otros factores considerados en el diseño tienen un efecto muy pequeño en relación con los tres factores antes mencionados.

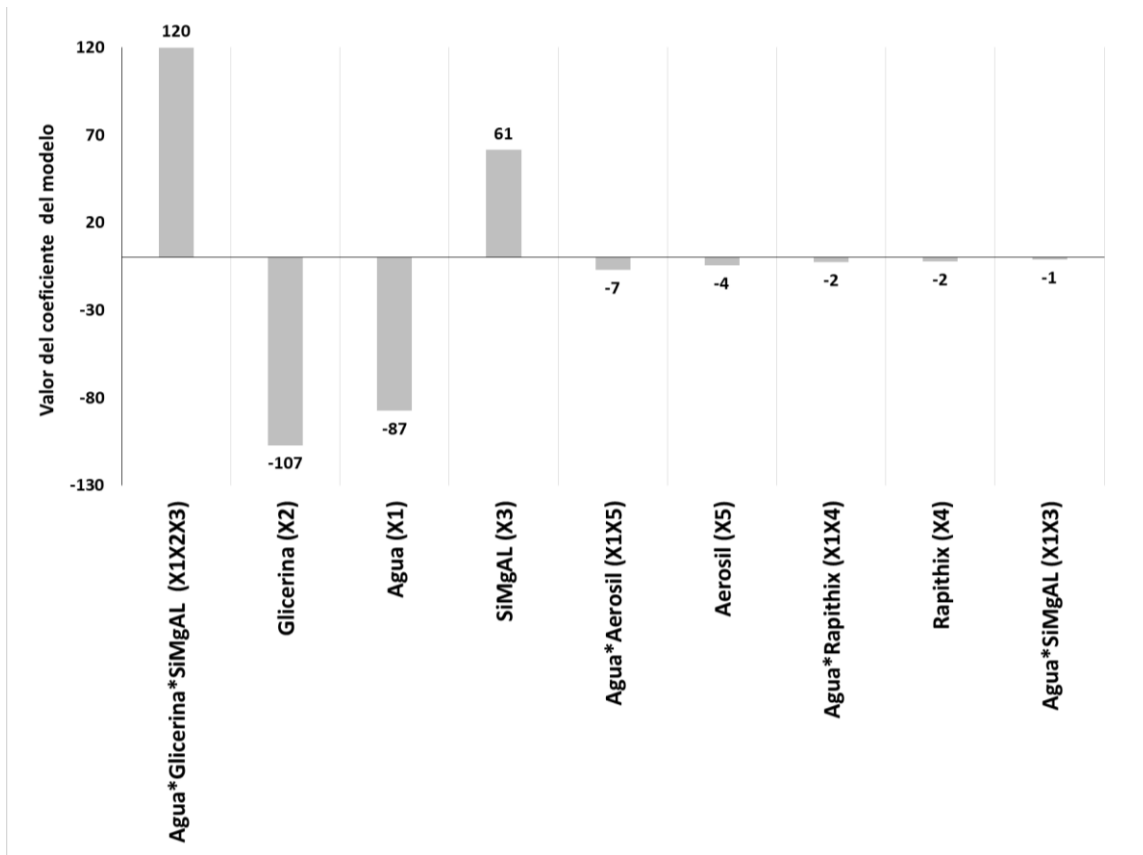


Figura 7. Coeficientes del modelo determinado para la velocidad de flujo (Y_1) de la pasta, graficados en orden decreciente de afectación de los factores a la variable de respuesta Y_1 .

4. Densidad de las pastas (Y_2)

El análisis de variancia de la densidad de las diez fórmulas se compararon y mostraron diferencias significativas entre ellas ($p < 0.05$), como lo muestra la Tabla 7 y su comportamiento gráfico en la Figura 8, en donde se marca con un círculo rojo la fórmula P-GA-03 porque fue la que presentó mayor facilidad para dosificarla a través de una jeringa y no presentó problemas de estabilidad, por lo cual fue seleccionada como la formulación óptima.

Tabla 7. Análisis de variancia que se aplicó para comparar la densidad de las diez fórmulas del diseño experimental.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.44209	9	0.04912	224.43	0.0000
Intra grupos	0.00438	20	0.00022		
Total	0.4465	29			

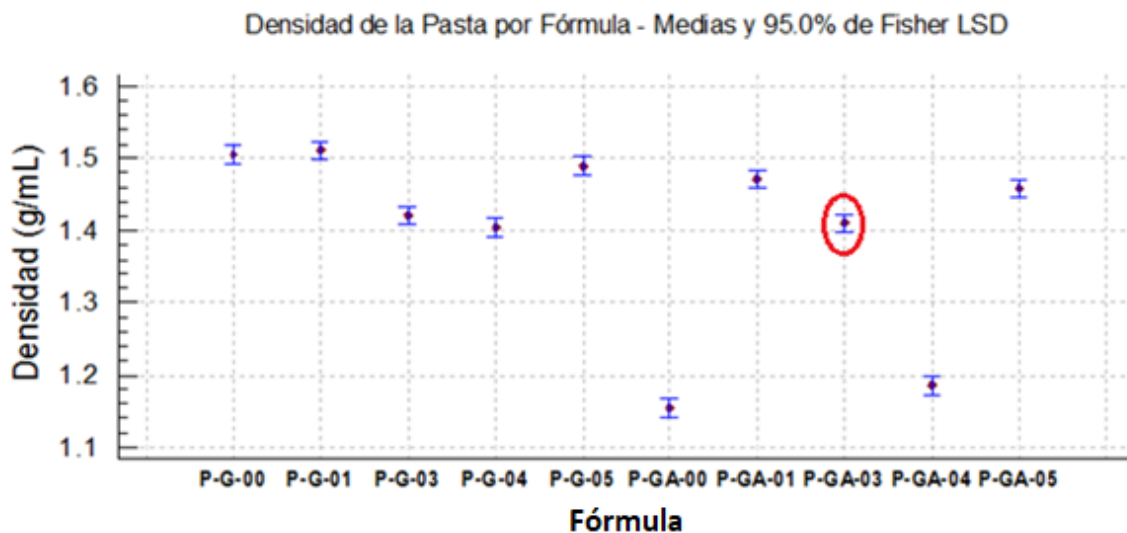


Figura 8. Comparación de las medias de las densidades de las diez fórmulas del diseño experimental. Los intervalos mostrados están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con 95% de confianza. Se marcó con un círculo rojo la formulación óptima.

Para determinar el efecto de cada uno de los siete factores considerados en el diseño experimental sobre la variación de la densidad de las pastas de Subsalicilato de Bismuto, se analizaron los resultados a través de modelos lineales generalizados con el programa de Statgraphics Centurion versión XV.

El modelo determinado para explicar la variación de la densidad de las pastas de Subsalicilato de Bismuto (Y_2) fue:

$$Y_2 = -0.23 - 0.52X_1 - 0.40X_2 + 0.27X_3 + 0.15X_5 - 2.48X_1X_2 - 0.22X_1X_3 - 0.08X_1X_5 - 0.16X_1X_2X_4$$

$R^2 = 0.9899$ con nivel de significancia de los coeficientes del modelo $p < 0.05$

El modelo determinado nos permitió determinar que la variación de la densidad (Y_2) de las pastas depende principalmente de la interacción entre el agua (X_1) y la glicerina (X_2). En la Figura 9 se muestran los coeficientes del modelo que son indicadores del efecto que tiene de cada uno de los factores implicados en el modelo sobre la variación de la densidad de las pastas de Subsalicilato de Bismuto. El agua y la glicerina tienen una relación inversamente proporcional con la densidad de las pastas y el silicato de magnesio y aluminio tiene una relación directamente proporcional. Estos factores presentan el mismo tipo de relación con la velocidad de flujo de las pastas.

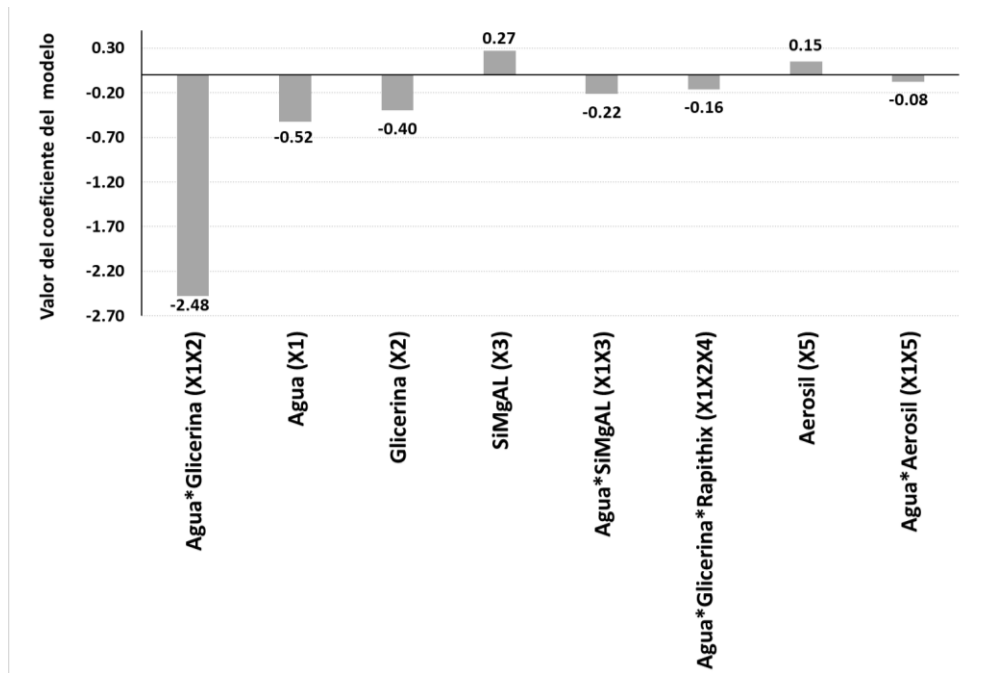


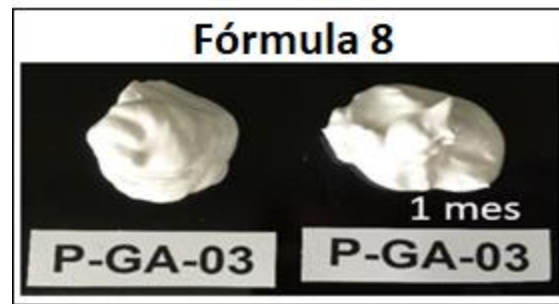
Figura 9. Coeficientes del modelo determinado para la densidad (Y_2) de las pastas, graficados en orden decreciente de afectación de los factores a la variable de respuesta Y_2 .

5. Fórmula seleccionada como óptima

La fórmula que presentó mayor facilidad de aplicación a través de una jeringa y mejor estabilidad física fue la Fórmula 8 cuyo código de lote fue P-GA-03 (Figura 10) la cual se seleccionó como la fórmula óptima y cuya composición es la que se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Composición de la Fórmula 8 con código de lote P-GA-03 considerada como óptima.

Componente	%
Subsalicilato de Bismuto	30.0
Glicerina	32.2
Polietilenglicol 400	1.0
Aerosil	4.5
Optiphen®	0.1
Agua	32.2



(A)



(B)

Figura 10. Imágenes de la formulación óptima seleccionada después de las pruebas de evaluación de atributos de calidad, velocidad de flujo y densidad. A) Observación visual de la estabilidad física; B) Jeringa contenedora de la pasta P-GA-03 con dosis de 9 g de Subsalicilato de Bismuto.

Además, dicha formulación presentó una densidad intermedia (1.41 g/mL) con respecto al resto, así como una velocidad de flujo de 11.63 g/s, siendo una de las dos pastas con mayor fluidez.

Por estos motivos, la pasta con la denominación P-GA-03 fue seleccionada como óptima porque cumple con los atributos de calidad previamente establecidos y por lo tanto a esta fórmula se le evaluó su estabilidad con el NIR y se evaluó su efecto sobre *Salmonella*, mesófilos y coliformes en heces de equinos.

6. Caracterización de la Fórmula 8 con código de lote P-GA-03 con NIR considerada como óptima

La Fórmula 8 con código de lote P-GA-03 seleccionada como óptima se caracterizó por infrarrojo cercano (NIR) para explorar su estabilidad. Se analizó el comportamiento del espectro de infrarrojo cercano de este lote con 2 condiciones de estrés, a 60°C y bajo la luz ultravioleta y se compararon sus comportamientos al tiempo 0, 60 y 160 días (Figuras 11, 12 y 13). En la Figura 12 y en la Figura 13 se observan cambios en los espectros a los 60 y 160 días por lo que se deduce que la pasta no es estable bajo las condiciones de estrés estudiadas. Por lo que se recomienda hacer un estudio detallado posterior a éste, de la estabilidad de la pasta para determinar fecha de caducidad y condiciones de almacenamiento en anaquel.

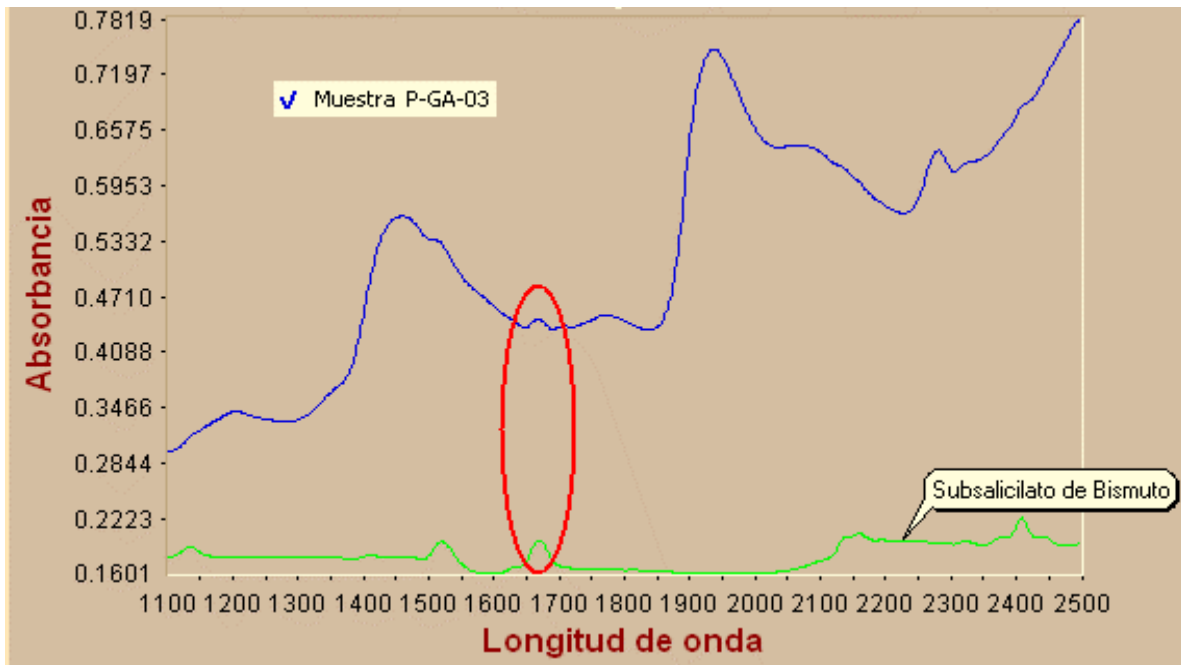


Figura 11. Comparación de los espectros del NIR del Subsalicilato de Bismuto y de la formulación óptima seleccionada (P-GA-03) al tiempo cero previo a someterla bajo condiciones de estrés.

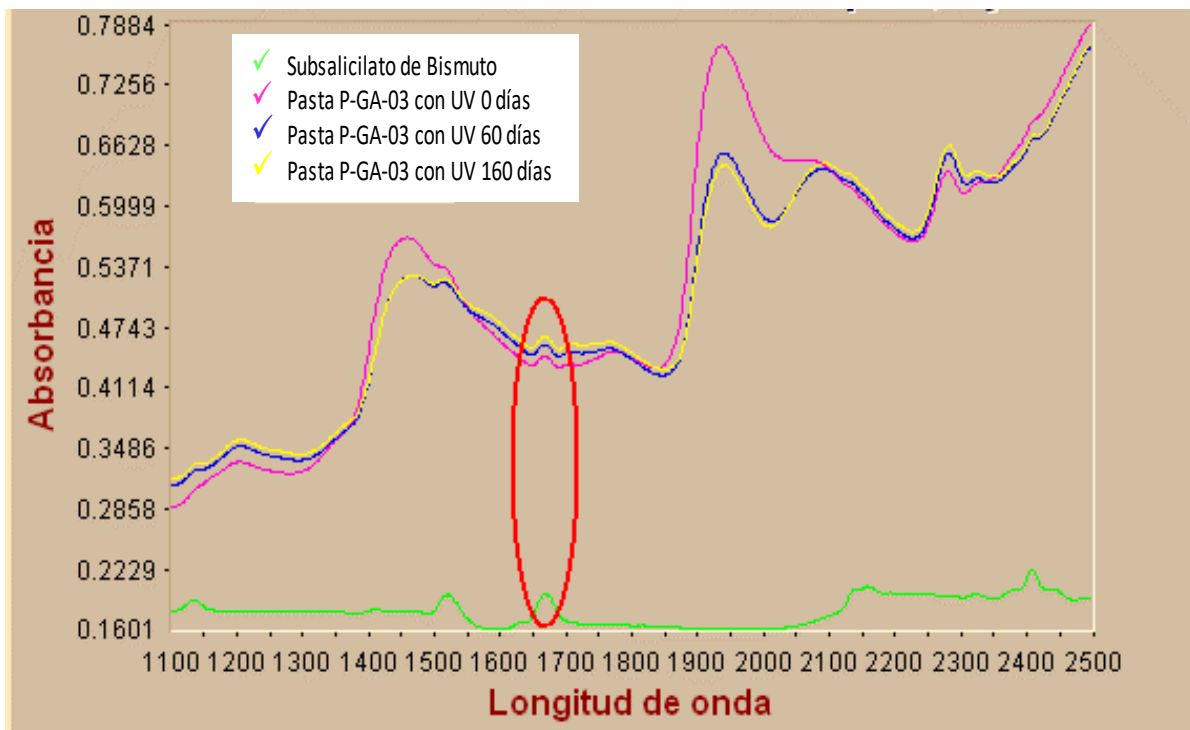


Figura 12. Espectros de NIR de la Fórmula 8, con código de lote P-GA-03 evaluada a los 0, 60 y 160 días de encontrarse bajo condiciones de luz ultravioleta.

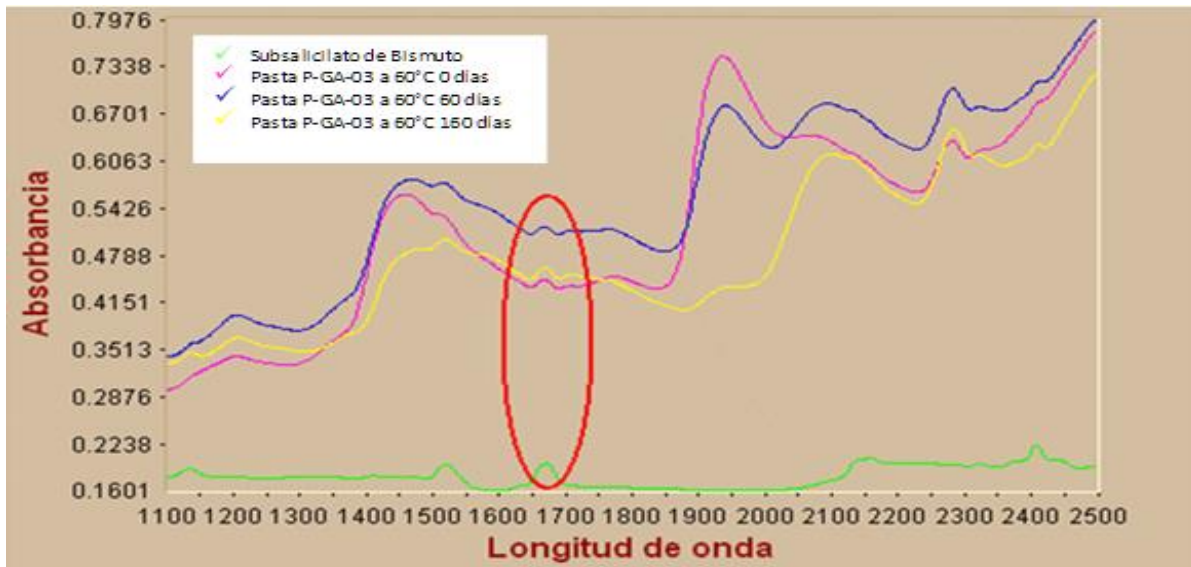


Figura 13. Espectros de NIR de la Fórmula 8, con código de lote P-GA-03 evaluada a los 0, 60 y 160 días de encontrarse bajo condiciones de temperatura de 60°C.

7. Pruebas bacteriológicas en heces de equino

Dada la gran diversidad en la población bacteriana que existe como flora normal del tracto gastrointestinal del equino clínicamente sano, se evaluaron 3 grupos de bacterias considerados dentro de los trastornos digestivos de la especie equina: *Salmonella*, mesófilos y coliformes.

Los conteos iniciales de UFC de mesófilos y coliformes muestran una amplia diferencia intra-individuo e inter-individuos, por tal motivo cada equino funcionó como su propio control (muestreo al tiempo cero).

Los resultados de las evaluaciones comparativas del comportamiento de la suspensión y de la pasta en los dos equinos sanos (Unidad Experimental 1 y Unidad Experimental 2) se muestran en la Tabla 9, correspondiente a la comparación de mesófilos y en la Tabla 10 se presentan los resultados de coliformes. En ninguna de las unidades experimentales se observó crecimiento de *Salmonella* por lo que no se reportó.

Por limitantes de tiempo y de disponibilidad de unidades experimentales solo se hizo una exploración en un equino con diarrea (Unidad Experimental 3), cuyos resultados se muestran en la Tabla 10 y las Figuras 14 y 15.

Tabla 9. Comparación del conteo de Unidades Formadoras de Colonias de mesófilos en heces de equinos tratados con Subsalicilato de Bismuto en suspensión comercial o pasta óptima seleccionada (P-GA-03).

Tiempo de muestreo (horas)	MESÓFILOS									
	Suspensión de SSB				Pasta de SSB					
	UE1		UE2		UE1		UE2		UE3	
	UFC/g	Log UFC/g	UFC/g	Log UFC/g	UFC/g	Log UFC/g	UFC/g	Log UFC/g	UFC/g	Log UFC/g
0	10,000,000	7.0	100,000	5.0	1,000,000	6.0	10,000,000	7.0	2,040,000,000	9.3
2	1,000,000	6.0	10,000,000	7.0	1,000	3.0	Incontables	#¡VALOR!	10,000,000	7.0
4	200,000	5.3	100,000	5.0	900,000	6.0	3,000,000	6.5	10,000,000	7.0
8	Incontables	#¡VALOR!	10,000,000	7.0	4,000,000	6.6	3,000,000	6.5	1,000,000	6.0
12	500,000	5.7	500,000,000	8.7	10,000,000	7.0	520,000,000	8.7	10,000,000	7.0

*UE1 y UE2 – equinos clínicamente sanos; UE3 – equino con diarrea.

Tabla 10. Comparación del conteo de Unidades Formadoras de Colonias de coliformes en heces de equinos tratados con Subsalicilato de Bismuto en suspensión comercial o pasta óptima seleccionada (P-GA-03).

Tiempo de muestreo (horas)	COLIFORMES									
	Suspensión de SSB				Pasta de SSB					
	UE1		UE2		UE1		UE2		UE3	
	UFC/g	Log UFC/g	UFC/g	Log UFC/g	UFC/g	Log UFC/g	UFC/g	Log UFC/g	UFC/g	Log UFC/g
0	10000000	7.0	1,000,000	6.0	1,400,000	6.1	40,000	4.6	400,000	5.6
2	400000	5.6	1,000	3.0	300	2.5	Incontables	#¡VALOR!	1,000,000	6.0
4	100000	5.0	30,000	4.5	400,000	5.6	20,000	4.3	1,000,000	6.0
8	1000000	6.0	7,000,000	6.8	6,000,000	6.8	100,000	5.0	10,000,000	7.0
12	100000	5.0	50,000	4.7	5,000,000	6.7	580,000,000	8.8	1,200,000	6.1

*UE1 y UE2 – equinos clínicamente sanos; UE3 – equino con diarrea.

Se observó que al administrar la suspensión de Subsalicilato de Bismuto hubo una disminución del número de UFC de mesófilos a las 4 hrs. post-administración en la UE1 así como en la UE2. Posteriormente el número de colonias aumentó en ambos casos (Tabla 9).

Con la administración de la pasta P-GA-03 (fórmula óptima seleccionada) se observó una disminución en el número de UFC de mesófilos a las 2 hrs. en la UE1, el cual posteriormente aumentó paulatinamente. En la UE2, la disminución de mesófilos se observó a las 4 hrs., manteniéndose hasta las 8 hrs (Tabla 9).

En el equino con diarrea (UE3) se observó una disminución en el número de UFC de mesófilos a las 2 hrs., manteniéndose a las 4 hrs. Posteriormente el número de mesófilos disminuyó nuevamente a las 8 hrs. (Tabla 9 y Figura 14).

Al ser administrada la suspensión de Subsalicilato de Bismuto, se observó una disminución en el número de UFC de coliformes a las 2 horas post-administración en la UE1 y continuó disminuyendo a las 4 hrs. En la UE2, se observó una disminución a las 2 hrs. y posteriormente se observó un aumento paulatino hasta las 8 hrs. (Tabla 10).

Con la administración de la pasta P-GA-03 (fórmula óptima seleccionada) se observó una disminución en el conteo de UFC de coliformes a las 2 hrs. post-administración en la UE1; posteriormente el número de colonias comenzó a aumentar paulatinamente. En la UE2 se observó disminución en el número de UFC de coliformes a las 4 hrs. post-administración y aumentó paulatinamente (Tabla 10).

Las UFC de coliformes en el equino con diarrea (UE3) mostró un aumento a las 2 hrs. que se mantuvo hasta las 4 hrs. Posteriormente se observó un aumento a las 8 hrs. y finalmente una disminución a las 12 hrs. (Tabla 10 y Figura 14).

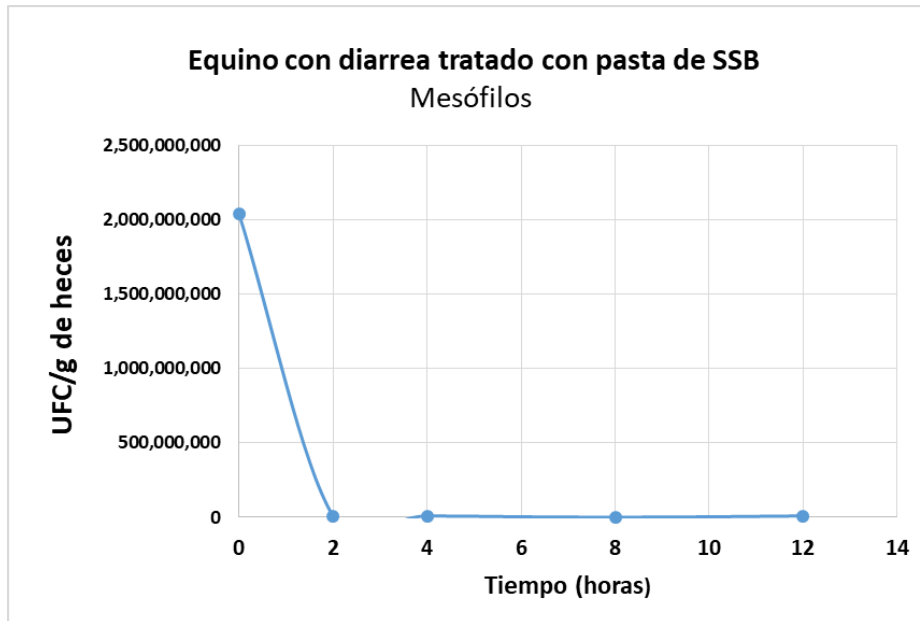


Figura 14. Gráfico que muestra el conteo bacteriológico de mesófilos en heces post-tratamiento con SSB en pasta en un equino con diarrea.

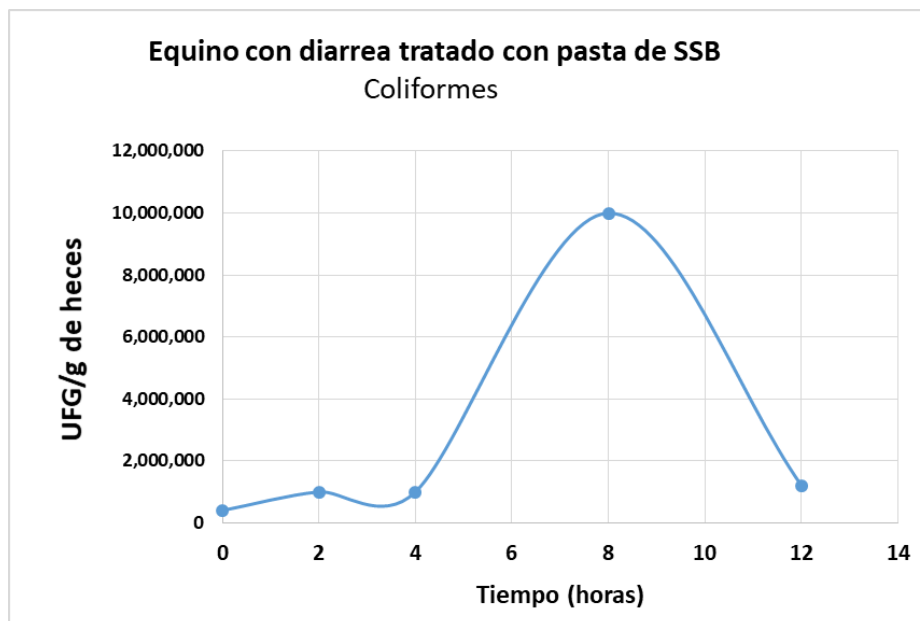


Figura 15. Gráfico que muestra el conteo bacteriológico de coliformes en heces post-tratamiento con SSB en pasta en un equino con diarrea.

Los caballos son descritos como fermentadores en el intestino posterior y dependen de la fermentación microbiana *in situ* ya que no producen endógenamente las enzimas para la degradación de los carbohidratos estructurales de las plantas. La compleja comunidad microbiana albergada tanto el ciego como el colon contribuye a los procesos digestivos habilitando al caballo para extraer energía de los componentes de su dieta. El plan alimenticio que se instaure para el caballo debe también tomar en consideración las características anatómicas y fisiológicas del sistema digestivo del mismo (Al Jassim y Andrews, 2009).

La disbiosis, o trastornos de la microbiota, se puede asociar a distintas enfermedades en el tracto intestinal incluyendo colitis (Costa *et al.*, 2012) y cólico (Weese *et al.*, 2014). Además del tipo de alimentación suministrada al caballo así como cambios abruptos en la misma, existen otros factores que pueden contribuir al desarrollo de enfermedad gastrointestinal como son el estrés del transporte, ayuno, efectos de los agentes anestésicos, impacto de la cirugía o la terapia antimicrobiana (Gronvold *et al.*, 2010) y desarrollar cuadros de diarrea, colitis y cólico (Andersen *et al.*, 2006; Nelson *et al.*, 2013).

Debido a que la composición microbiana fecal no refleja por completo la composición microbiana de distintas regiones en el tracto gastrointestinal, la interpretación de los cambios en la microbiota se hace difícil (Dougal *et al.*, 2012; Schoster *et al.*, 2013).

El uso del Subsalicilato de Bismuto en pasta desarrollada en el presente estudio, mostró que los conteos de bacterias mesófilas en heces del caballo disminuyen y se controlan de mejor manera que las bacterias coliformes, sobre todo en el caso de diarrea. Esto es de gran importancia, ya que la presentación de diarrea, no solo puede deberse a algún microorganismo patógeno, sino también por desequilibrios en la microbiota normal y crecimiento de bacterias oportunistas endógenas del tracto gastrointestinal. De manera general, estas bacterias requieren condiciones de crecimiento entre 30-37°C, lo que las clasifica, por su temperatura, en el grupo de las bacterias mesófilas.

VII. CONCLUSIONES

Se desarrolló una fórmula innovadora en pasta a base de Subsalicilato de Bismuto que facilita la administración del SSB en el equino minimizando el estrés que es provocado por la administración vía sonda nasogástrica de la suspensión existente en el mercado veterinario.

A través de una jeringa de 20 mL se pudo administrar 30 g de la pasta seleccionada como óptima, que equivale a 9 g de SSB y comparando con la suspensión que se aplican 9 g en un volumen de 500 mL a través de sonda nasogástrica, esto facilita la administración del SSB a nivel ambulatorio.

La formulación óptima seleccionada aparentemente tiene efecto mayor sobre mesófilos que sobre coliformes, incluyendo el caso de diarrea, pero esto requiere ser verificado posteriormente con un número mayor de unidades experimentales para ver su significancia estadística.



VIII. PERSPECTIVAS

1. Evaluar la estabilidad de la pasta de acuerdo a la normatividad internacional del VICH GL4 (Stability Testing for New Veterinary Dosage Forms).
2. Comparar la eficacia de la pasta de SSB con la suspensión comercial de SSB en padecimientos de diarrea en el equino.
3. Comparar la farmacocinética de la pasta de SSB contra la de la suspensión de SSB.
4. Definir el tiempo de retiro de la pasta de SSB para el caso de que sea administrada a equinos destinados a la producción de alimentos para humanos.

IX. ANEXOS

1. Procedimientos

1.1. Procedimiento para la evaluación de los atributos de calidad requeridos de la pasta

1. Un mes después de haber fabricado los lotes, separarlos y agrupar las 10 fórmulas diseñadas inicialmente.
2. Ordenarlos de acuerdo a la denominación de la fórmula que se les dio tomando en cuenta la presencia o ausencia de agua dentro de la formulación así como el resto de los excipientes.
3. Inicialmente evaluar de manera visual si hay separación entre el o los agentes humectantes, según sea el caso, y el resto de los componentes de la formulación; así como cambios de coloración, textura o consistencia y contaminación por microorganismos (principalmente de tipo fúngico).
4. Anotar las observaciones de los cambios físicos que sean evidentes comparando las fotografías tomadas al momento de la preparación y volver a cerrar los envases empleados.
5. Después de un mes de la fecha de fabricación separar nuevamente por lotes y agrupar las 10 fórmulas.
6. Evaluar de manera visual si existe la separación entre el o los agentes humectantes, según sea el caso, y el resto de los componentes de la formulación; cambios de coloración, textura o consistencia así como contaminación por microorganismos (principalmente de tipo fúngico).
7. Anotar las observaciones de los cambios físicos que sean evidentes comparando las fotografías tomadas al momento de la preparación y volver a cerrar los envases empleados.

1.2. Procedimiento para la evaluación de la velocidad de flujo

1. Pesar un vaso de precipitados de 100 mL vacío.

2. Colocar dentro de una jeringa de 5 mL una cantidad determinada de pasta de modo que se llene hasta la última línea y compactándola para evitar variaciones por la presencia de aire dentro de la misma.
3. Una vez llena, pesar la jeringa con la pasta en el vaso de precipitados de 100 mL.
4. Posteriormente colocar y estabilizar la jeringa en la boquilla de un matraz aforado de 200 mL como soporte.
5. Por otro lado, preparar el dispositivo con los dos soportes metálicos y entre ellos colocar las pesas en forma de barras metálicas y asegurarse de que el sistema funciona correctamente.
6. Colocar el matraz que contiene la jeringa entre los dos soportes metálicos y debajo de las pesas, verificando que todo el sistema esté alineado.
7. Soltar las pesas sobre el émbolo de la jeringa para que la pasta sea desplazada.
8. Cronometrar el tiempo que las pesas tardan en desplazar la pasta de la jeringa hacia el matraz.
9. A continuación pesar la jeringa vacía en el mismo vaso de precipitados que se empleó al inicio.
10. Pesar nuevamente el vaso de precipitados vacío.
11. Realizar la prueba por triplicado para cada lote utilizando una jeringa nueva en cada repetición para evitar la acumulación de sólidos en el émbolo que pueda modificar el resultado.
12. La velocidad de flujo de cada formulación es determinada empleando la media de cada elemento en la siguiente fórmula:

$$VelFlujo = \frac{(P_2 - P_1) - (P_3 - P_4)}{t}$$

Donde P_1 es el peso del vaso de precipitados vacío al inicio de la prueba, P_2 es el del vaso de precipitados conteniendo la jeringa llena de la pasta de interés, P_3 es el peso de la jeringa vacía después de la prueba dentro del vaso de precipitados, P_4 es el peso del vaso de

precipitados vacío al final de la prueba y t es el tiempo que tardó en desplazarse el contenido de la jeringa fuera de la misma.

1.3. Procedimiento para la evaluación de la densidad

1. Pesar el picnómetro de acero inoxidable vacío y anotar su peso.
2. Colocar una muestra de la formulación en el picnómetro compactándola para evitar variaciones en las determinaciones por la presencia de aire.
3. Limpiar los excedentes de la muestra que se encuentren por la parte externa del picnómetro.
4. Pesar el picnómetro con la muestra y anotar su peso.
5. Lavar el picnómetro y secarlo por completo.
6. Llenar el picnómetro con agua desionizada y secarlo por la parte externa para evitar variaciones en las determinaciones.
7. Secar el picnómetro por completo por la parte interna y externa.
8. Realizar 2 repeticiones para la misma formulación siguiendo el mismo procedimiento.
9. Realizar el procedimiento completo para cada una de las formulaciones hasta completar los 10 lotes.
10. La densidad de cada formulación es determinada empleando la media de cada elemento en la siguiente fórmula:

$$P = \frac{(M_2 - M_1)}{(M_3 - M_1)}$$

Donde P es la densidad, M_1 es el peso del picnómetro vacío, M_2 es peso del picnómetro lleno de la muestra y M_3 es el peso del picnómetro lleno de agua desionizada.

1.4. Procedimiento para las pruebas de estabilidad de la pasta seleccionada como óptima (P-GA-03)

1. Pesar en la balanza analítica cantidades iguales (aproximadamente 500 mg) de los activos y los excipientes a evaluar por infrarrojo cercano.
2. Mezclar todas las posibles combinaciones entre principio activo vs. excipientes de la fórmula seleccionada estableciendo una mezcla 1:1 partes.
3. Inicialmente colocar una muestra de la mezcla en un vial de vidrio para evaluar el infrarrojo cercano en el tiempo cero.
4. Dejar reposar la mezcla a evaluar en condiciones ambientales (luz y temperatura) por un periodo de 60 días.
5. Después del periodo de tiempo, colocar una muestra de la mezcla en un vial de vidrio para evaluar en el infrarrojo cercano.
6. Compactar la muestra y leer en el NIR para obtener las lecturas de reflectancia de todas las combinaciones y evaluar si existe algún cambio en la huella química inicial.
7. Posteriormente dejar reposar nuevamente la mezcla a evaluar en condiciones ambientales (luz y temperatura) por un periodo de 100 días que corresponderán a 160 días desde el inicio.
8. Después del periodo de tiempo, colocar una muestra de la mezcla en un vial de vidrio para evaluar en el infrarrojo cercano.
9. Comparar las respuestas iniciales y finales del presente análisis.

1.5. Procedimiento para la obtención de muestra de heces

Para llevar a cabo la evaluación *in vivo* de la pasta a base de Subsalicilato de Bismuto en desarrollo y poder compararla con la suspensión existente en el mercado se realizará lo siguiente:

1.5.1. Para el estudio empleando la suspensión a base de Subsalicilato de Bismuto existente en el mercado veterinario nacional

1. Se requerirán 2 equinos de cualquier raza, edad y sexo que se encuentren clínicamente sanos.
2. Inicialmente y antes de la administración de la suspensión, realizar a cada equino una toma de muestra de heces vía transrectal con guante de palpación limpio para la obtención de aproximadamente 10 g de heces, la cual corresponderá al tiempo cero.
3. Posteriormente sondear al equino vía nasogástrica y administrarle por dicha vía 500 mL de suspensión comercial a base de SSB (o el equivalente a 9 g de Subsalicilato de Bismuto) diluidos en 1,200 mL de agua aproximadamente. Una vez que se haya realizado dicha administración retirar la sonda nasogástrica.
4. Realizar la toma de muestras de heces en las cantidades previamente mencionadas por las vías y métodos antes establecidos a las 2, 4, 8 y 12 horas después de la administración de la suspensión e identificarlas correctamente.
5. Dejar descansar los equinos al menos durante el periodo correspondiente a 10 vidas medias que en el caso del Subsalicilato de Bismuto corresponde a 30 horas. Una vez transcurrido este tiempo realizar el mismo procedimiento para la evaluación de la pasta en desarrollo en los mismos equinos (Figuras 16 y 17).

1.5.2. Para el estudio empleando la pasta en desarrollo a base de Subsalicilato de Bismuto

1.5.2.1. Equinos clínicamente sanos

1. Se requerirán 2 equinos de cualquier raza, edad y sexo que se encuentren clínicamente sanos.
2. Inicialmente y antes de la administración de la pasta, realizar a cada equino una toma de muestra de heces vía transrectal con guante de palpación limpio para la obtención de aproximadamente 10 g de heces, que corresponderá al tiempo cero.
3. Posteriormente administrar al equino vía oral 30 g de la pasta en desarrollo a base de SSB (o el equivalente a 9 g de Subsalicilato de Bismuto).
4. Realizar la toma de muestras de heces en las cantidades previamente mencionadas por las vías y métodos antes establecidos a las 2, 4, 8 y 12 horas después de la administración de la suspensión e identificarlas correctamente (Figuras 16 y 17).

1.5.2.2. Equino con cuadro de diarrea

1. Se requerirá 1 equino que presente cuadro de diarrea, esto es, cambios en la consistencia de las heces siendo más acuosas.
2. Inicialmente y antes de la administración de la pasta, realizar una toma de muestra de heces vía transrectal con guante de palpación limpio para la obtención de aproximadamente 10 g de heces, que corresponderá al tiempo cero.

3. Posteriormente administrar al equino vía oral 15 g de la pasta en desarrollo a base de SSB (o el equivalente a 4.5 g de Subsalicilato de Bismuto).
4. Repetir la dosis establecida cada 4 horas.
5. Realizar la toma de muestras de heces en las cantidades previamente mencionadas por las vías y métodos antes establecidos a las 2, 4, 8 y 12 horas después de la administración de la suspensión e identificarlas correctamente (Figura 16 y 17).

1.6. Procedimiento para la identificación de grupos bacterianos y conteo de UFC de interés en muestra de heces

1. Realizar la preparación de medios así como la siembra de la muestra y lectura de resultados bajo condiciones de esterilidad y procedimientos habituales en el laboratorio de Bacteriología.
2. Preparar SSF 9% para las diluciones de las muestras fecales.
3. Preparar los medios de Cuenta Estándar, MacConkey y Verde Brillante de acuerdo a las indicaciones del fabricante.
4. Para la siembra de la muestra:
5. Abrir cuidadosamente el guante de palpación y tomar con una espátula 1 g de la muestra fecal y pesarla en una balanza digital.
6. Transferir la muestra fecal a un tubo de ensaye con 9 mL de SSF 9% y comenzar a hacer las diluciones 1 en 10 así como la siembra de la muestra en los 3 diferentes agares en cajas de Petri y cambiando la punta de la micropipeta en cada dilución.
7. Incubar a 48°C en la estufa incubadora durante 24 horas.
8. Transcurridas las 24 horas leer los resultados y anotar la cantidad de UFC de la última dilución que tuvo crecimiento en cada medio de cultivo (Figura 17).



(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 16. Imágenes de los procedimientos realizados para las pruebas bacteriológicas post-tratamiento con SSB en suspensión (comercial) y pasta. A) y B) Administración de SSB en suspensión comercial, C) y D) Administración de SSB en pasta (P-GA-03).



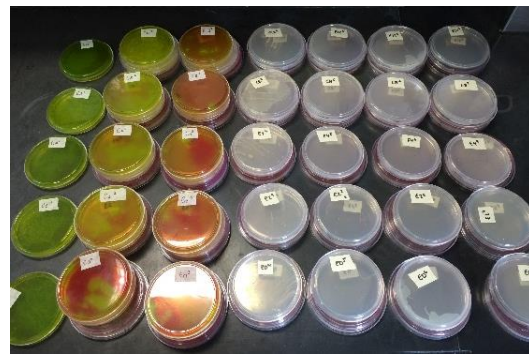
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 17. Imágenes de los procedimientos realizados para las pruebas bacteriológicas post-tratamiento con SSB en suspensión (comercial) y pasta. A) Obtención de muestra fecal, B) Diluciones logarítmicas, C) Siembra de cada dilución en medios de Agar Verde Brillante, MacConkey y Cuenta Estándar, D) Cultivos bacterianos a las 24 horas.

2. Formulaciones de las pastas de Subsalicilato de Bismuto

Tabla 11. Descripción de las diez formulaciones de la pasta de Subsalicilato de Bismuto utilizando diferentes porcentajes de glicerina y agua así como distintos modificadores reológicos y un conservador. (Todas las formulaciones contienen 0.1% de Optiphen como conservador).

	Lote	Agua	Glicerina	SiMgAL	Rapithix	Aerosil	Peg 400	Natrosol
		%	%	%	%	%	%	%
Factores no codificados	P-GA-00	35.0	35.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	P-GA-05	33.5	33.5	0.0	3.0	0.0	0.0	0.0
	P-G-01	0.0	59.9	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	P-G-05	0.0	66.9	0.0	3.0	0.0	0.0	0.0
	P-GA-04	34.5	34.5	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0
	P-G-04	0.0	68.9	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0
	P-GA-01	30.0	30.0	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	P-GA-03	32.2	32.2	0.0	0.0	4.5	1.0	0.0
	P-G-03	0.0	64.4	0.0	0.0	4.5	1.0	0.0
	P-G-00	0.0	69.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Factores codificados	P-GA-00	1.0	-0.8	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
	P-GA-05	0.9	-0.8	-1.0	1.0	-1.0	-1.0	-1.0
	P-G-01	-1.0	0.5	1.0	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
	P-G-05	-1.0	0.9	-1.0	1.0	-1.0	-1.0	-1.0
	P-GA-04	1.0	-0.8	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0	1.0
	P-G-04	-1.0	1.0	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0	1.0
	P-GA-01	0.7	-1.0	1.0	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
	P-GA-03	0.8	-0.9	-1.0	-1.0	1.0	1.0	-1.0
	P-G-03	-1.0	0.7	-1.0	-1.0	1.0	1.0	-1.0
	P-G-00	-1.0	1.0	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0

IX. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Alinovi, C.A., Ward, M.P., Couetil, L.L., Wu, C.C. (2003). Risk factors for fecal shedding of *Salmonella* from horses in a veterinary teaching hospital. *Prev Vet Med*, 60(4):307–17.
2. Al Jassim, R.A., Rowe, J.B. (1999). Better understanding of acidosis and its control. En: Corbett, J.L. (Editor). *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia*. Armidale, Australia: University of New England.
3. Al Jassim, R.A.M., Scott, P.T., Trebbin, A.L., Trott, D., Pollitt, C.C. (2005b). The genetic diversity of lactic acid producing bacteria in the equine gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol Lett*, 248:75–81.
4. Al Jassim, R.A.M., Andrews, F.M. (2009). The bacterial community of the horse gastrointestinal tract and its relation to fermentative acidosis, laminitis, colic, and stomach ulcers. *Vet Clin Equine* 25, 199-215.
5. Amavisit, P., Markham, P.F., Lightfoot, D., *et al.* (2001). Molecular epidemiology of *Salmonella heidelberg* in an equine hospital. *Vet Microbiol*, 80(1):85–98.
6. Andersen, M.S., Clark, L., Dyson, S.J., Newton, J.R. (2006). Risk factors for colic in horses after general anaesthesia for MRI or nonabdominal surgery: absence of evidence of effect from perianaesthetic morphine. *Equine Vet. J*, 38, 368-374.
7. Andersson, G., Ekman, L., Mansson, I., Persson, S., Rubarth, S., Tufresson, G. (1971). Lethal complications following administration of oxytetracycline in the horse. *Nordisk. Veterinärmed*, 23, 9-22.
8. Arroyo, L.G., Weese, S., Staempfli, H.R. (2004). Experimental *Clostridium difficile* enterocolitis in foals. *J Vet Intern Med*, 18:734-8.
9. Baker, J.R. (1969). An outbreak of salmonellosis involving veterinary hospital patients. *Vet Rec*, 85:8–10.
10. Baker, J.R. (1970). Salmonellosis in the horse. *Br Vet J*, 126:100–5.
11. Barbut, F., Petit, J.C. (2001). Epidemiology of *Clostridium difficile*-associated infections. *Clin Microbiol Infect*, 7:405-10.
12. Baverud, V., Gustafsson, A., Franklin, A., Lindoholm, A., Gunnarsson, A. (1997). *Clostridium difficile* associated with acute colitis in mature horses treated with antibiotics. *Equine Vet J*, 29(4):279-84.

13. Baverud, V., Franklin, A., Gunnarsson, A., Gustafsson, A., Hellander-Edman, A. (1998). *Clostridium difficile* associated with acute colitis in mares when their foals are treated with erythromycin and rifampin for *Rhodococcus equi* pneumonia. *Equine Vet J*, 30:482-8.
14. Baverud, V., Gustafsson, A., Franklin, A., Aspán, A., Gunnarsson, A. (2003). *Clostridium difficile*: prevalence in horses and environment, and antimicrobial susceptibility. *Equine Vet J*, 35(5):465-71.
15. Baverud, V. (2004). *Clostridium difficile* diarrhea: infection control in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 20:615-30.
16. Beier, R., Amtsberg, G., Peters, M. (1994). Bakteriologische Untersuchungen zum Vorkommen und Bedeutung von *Clostridium difficile* beim Pferd. *Pferdeheilkunde*, 10:3-8.
17. Bierer, D.W. (1990). Bismuth subsalicylate: history, chemistry, and safety. *Rev Infect Dis*. Jan-Feb;12 Suppl 1:S3-8. Review.
18. Blackmore, T.M., Dugdale, A., Argo, C.M., Curtis, G., Pinloche, E., Harris, P.A., Worgan, H.J., Girdwood, S.E., Dougal, K., Newbold, C.J. y McEwan, N.R. (2013). Strong stability and host specific bacterial community in faeces of ponies. *PLoS One*, 8, e75079.
19. Blaser, M.J. (1992). Hypotheses on the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Gastroenterology*, 102:720-727.
20. Bode, J.C., Rust, S., Bode, C., (1984). The effect of cimetidine treatment on ethanol formation in the human stomach. *Scand. J. Gastroenterol*, 19:853-856.
21. Bryans, J., Fallon, E.H., Shephard, B.P. (1961). Equine salmonellosis. *Cornell Vet*, 51:467-77.
22. Buechner, V. (1989). The use of antimicrobial therapy in gastrointestinal disease in the adult horse. *Equine Pract*, 11(10):9-14.
23. Bueschel, D., Walker, R., Woods, L., Kokai-Kun, J., McClane, B., Songer, J.G. (1998). Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A necrotic enteritis in a foal. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 213, 1305-1307.
24. Burke, V., Gracey, M. (1980). Effects of salicylate on intestinal absorption: *in vitro* and *in vivo* studies with enterotoxigenic microorganisms. *Gut*, 21:683-690.
25. Carter, J.D., Hird, D.W., Farver, T.B., Hjrpe, C.A. (1986). Salmonellosis in hospitalized horses: seasonality and case fatality rates. *J Am Vet Med Assoc*, 188:163-7.

26. Castor, M.L., Wooley, R.E., Schotts, E.B., Brown, J., Payeur, J.B. (1989). Characteristics of *Salmonella* isolated from an outbreak of equine salmonellosis in a veterinary teaching hospital. *Journal of Equine Veterinary Science*, 9(5):236–41.
27. Centers for Disease Control. Salmonella surveillance: annual summary, 2004. Atlanta (GA): US Department of Health and Human Services, CDC; 2006.
28. Chapman, A.M. (2009). Acute Diarrhea in Hospitalized Horses. *Vet Clin Equine*, 25:363-380.
29. Chouraqui, J.P., Grathwohl, D., Labaune, J.M., Hascoet, J.M., de Montgolfier, I., Leclaire, M., Giarre, M., Steenhout, P. (2008) Assessment of the safety, tolerance, and protective effect against diarrhea of infant formulas containing mixtures of probiotics or probiotics and prebiotics in a randomized controlled trial. *Am. J. clin. Nutr.* 87:1365-1373.
30. Chowdhury, H.R., Yunus, M., Zaman, K., Rahman, A., Faruque, S.M., Lescano, A.G., Sack, R.B. (2001). The efficacy of Bismuth subsalicylate in the treatment of acute diarrhoea and the prevention of persistent diarrhoea. *Acta Paediatr.*, 90:605-610.
31. Clark, C.K., Merritt, A.M., Burrow, J.A., Steible, C.K. (1996). Effect of aluminum hydroxide/magnesium hydroxide antacid and Bismuth subsalicylate on gastric pH in horses. *J. Am. vet. med. Ass.*, 208:1687-1691.
32. Clark, M.A., Hirst, B.H., Jepson, M.A. (1998). Inoculum composition and *Salmonella* pathogenicity island 1 regulate M-cell invasion and epithelial destruction by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun*, (2):724-31.
33. Clarke, R.C., Gyles, C.L. (1993). *Salmonella*. En: Gyles, C.L., Thoen, C.O. (Editores). *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. 2ª edición. (pp. 133–53). Ames (IA): Iowa State University Press.
34. Cohen, N.D., Woods, A.M. (1992). Characteristics and risk factors for horses with acute diarrhea to survive: 22 cases (1990–1996). *J Am Vet Med Assoc*, 214(3): 382–90.
35. Cohen, N.D. (1994). Causes of and farm management factors associated with disease and death in foals. *J Am Vet Med Assoc*, 204:1644–51.
36. Cohen, N.D., Divers, T.J. (1998). Acute colitis in horses. Part I. Assessment. *Compend Contin Educ Pract Vet*, 20:92-8.
37. Cohen, N.D., Woods, A.M. (1999). Characteristics and risk factors for failure of horses with acute diarrhea to survive. *J Am Vet Med Assoc*, 214:382–90.

38. Cohen, N.D. (2002). Right Dorsal Colitis. *Equine Vet Educ*, 14(4):212-9.
39. Cohen, N.D., Carter, G.K., Mealey, R.H., Taylor, T.S. (2008). Medical management of right dorsal colitis in 5 horses: a retrospective study (1987–1993). *J Vet Intern Med*, 19(4):272–6.
40. Collatos, C., Barton, M.H., Moore, J.N. (1995). Fibrinolytic activity in plasma from horses with gastrointestinal diseases: changes associated with diagnosis, surgery, and outcome. *J. vet. intern. Med.*, 9, 18-23.
41. Collins, L.G., Tyler, D.E. (1984). Phenylbutazone toxicosis in the horse: a clinical study. *J Am Vet Med Assoc*, 184:699-703.
42. Cook, W.R. (1973). Diarrhoea in the horse associated with stress and tetracycline therapy. *Vet. Rec.*, 93:15-16.
43. Costa, M.C., Arroyo, L.G., Allen-Vercoe, E., Stämpfli, H.R., Kim, P.T., Sturgeon, A., Weese, J.S. (2012). Comparison of the fecal microbiota of healthy horses and horses with colitis by high throughput sequencing of the V3-V5 region of the 16S rRNA gene. *PLoS One*, 7, e41484.
44. Costa, M.C., Weese, J.S. (2012). The equine intestinal microbiome. *Anim. Health Res. Rev.*, 13:121-128.
45. Dallap Schaer, B.L., Aceto, H., Caruso 3rd, M.A., Brace, M.A. (2012). Identification of predictors of *Salmonella* shedding in adult horses presented for acute colic. *J vet intern med*, 26:1177–85.
46. Daly, K., Stewart, C.S., Flint, H.J., Shirazi-Beechey, S.P. (2001). Bacterial diversity within the equine large intestine as revealed by molecular analysis of cloned 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol Ecol*, 38:141–51.
47. Daly, K., Proudman, C.J., Duncan, S.H., Flint, H.J., Dyer, J., Shirazi-Beechey, S.P. (2012). Alterations in microbiota and fermentation products in equine large intestine in response to dietary variation and intestinal disease. *Br. J. Nutr.*, 107:989-995.
48. Dargatz, D.A., Traub-Dargatz, J.L. (2004). Multidrug-resistant *Salmonella* and nosocomial infections. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 20(3):587-600.
49. de Boer, W.A. (1999). Bismuth triple therapy: Still a very important drug regimen for curing *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 11:697–700.
50. Divers, T.J. (2002). Clostridial diarrhea in adult horses. En: Mair, T., Divers, T., Ducharme, N., (Editores). *Manual of equine gastroenterology*. 1ª edición. (pp. 410-2). Philadelphia: WB Saunders.

51. Donahue, J.M. (1986). Emergence of antibiotic-resistant *Salmonella agona* in horses in Kentucky. *J Am Vet Med Assoc*, 188(6):592–4.
52. Donaldson, M.T., Palmer, J.E. (1999). Prevalence of *Clostridium perfringens* enterotoxin and *Clostridium difficile* toxin A in feces of horses with diarrhea and colic. *J Am Vet Med Assoc*, 215:358–61.
53. Dorn, C.R., Coffman, J.R., Schmidt, D.A., Garner, H.E., Addison, J.B., McCune, E.L. (1975). Neutropenia and salmonellosis in hospitalized horses. *J Am Vet Med Assoc*, 166:65–7.
54. Dougal, K., Harris, P.A., Edwards, A., Pachebat, J.A., Blackmore, T.M., Worgan, H.J., Newbold, C.J. (2012). A comparison of the microbiome and the metabolome of different regions of the equine hindgut. *FEMS Microbiol. Ecol*, 82: 642-652.
55. Dougal, K., de la Fuente, G., Harris, P.A., Girdwood, S.E., Pinloche, E., Geor, R.J., Nielsen, B.D., Schott, H.C. 2nd, Elzinga, S., Newbold, C.J. (2014). Characterisation of the faecal bacterial community in adult and elderly horses fed a high fibre, high oil or high starch diet using 454 pyrosequencing. *PLoS One* 9, e87424.
56. Dresow, B., Nielsen, P., Fischer, R., Wendel, J., Gabbe, E.E., Heinrich, H.C. (1991). Bioavailability of bismuth from ²⁰⁵Bi-labelled pharmaceutical oral Bi-preparations in rats. *Arch. Toxicol.*, 65:646-650.
57. DuPont, H.L., Sullivan, P., Pickering, L.K., Haynes, G., Ackerman, P.B. (1977). Symptomatic treatment of diarrhea with Bismuth subsalicylate among students attending a Mexican university. *Gastroenterology*, 73;715-8.
58. DuPont, H.L., Ericsson, C.D., Johnson, P.G., Bitsura, J.A., DuPont, M.W., de la Cabada, F.J. (1987). Prevention of travelers' diarrhea by the tablet formulation of Bismuth subsalicylate. *JAMA*, 257:1347-1350.
59. East, L., Savage, C., Traub-Dargatz, J., Dickinson, C., Ellis, R. (1998). Enterocolitis associated with *Clostridium perfringens* infection in neonatal foals: 54 cases (1988–1997). *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 212:1751-1756.
60. Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., Relman, D.A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308:1635–1638.
61. Ekiri, A.B., Mackay, R.J., Gaskin, J.M., Freeman, D.E., House, A.M., Giguère, S., Troedsson, M.R., Schuman, C.D., von Chamier, M.M., Henry, K.M., Hernandez, J.A. (2008). Epidemiologic analysis of nosocomial *Salmonella* infections in hospitalized horses. (pp. 131-2). En: 9th International Equine Colic Research Symposium. Liverpool, UK.

62. Endo, A., Okada, S., Morita, H., (2007). Molecular profiling of *Lactobacillus Streptococcus*, and *Bifidobacterium* species in feces of active racehorses. *J. Gen. Appl. Microbiol*, 53:191–200.
63. Ensink, J.M., Klein, W.R., Barneveld, A., van Miert, A.S.J.P.A.M., Vulto, A.G. (1996). Side effects of oral antimicrobial agents in the horse: a comparison of pivampicillin and trimethoprim/sulphadiazine. *Vet. Rec.*, 138:253-256.
64. Ericsson, C.D., Evans, D.G., DuPont, H.L., Evans, D.J. Jr., Pickering, L.K. (1977). Bismuth subsalicylate inhibits activity of crude toxins of *Escherichi coli* and *Vibrio cholerae*. *J Infect Di*, 136:693-6.
65. Ericsson, C.D., Tannenbaum, C., Charles, T.T. (1990). Antisecretory and antiinflammatory properties of Bismuth subsalicylate. *Rev Infect Dis*, 12:Suppl 1:S16-S20.
66. Ernst, N.S., Hernandez, J.A., MacKay, R.J., Brown, M.P., Gaskin, J.M., Nguyen, A.D., Giguere, S., Colahan, P.T., Troedsson, M.R., Haines, G.R., Addison, I.R., Miller, B.J. (2004). Risk factors associated with fecal *Salmonella* shedding among hospitalized horses with signs of gastrointestinal tract disease. *J Am Vet Med Assoc*, 225(2):275–81.
67. Fankhauser, R.L., Noel, J.S., Monroe, S.S., Ando, T., Glass, R.I. (1998). Molecular epidemiology of “Norwalk-like viruses” in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J. Infect. Dis.*, 178:1571–1578.
68. Farris, R.K., Tapper, E.J., Powell, D.W., Morris, S.M. (1976). Effect of aspirin on normal and cholera toxin–stimulated intestinal electrolyte transport. *J Clin Invest*, 57:916–924.
69. Feary, D.J., Hassel, D.M. (2006). Enteritis and colitis in horses. *Vet. Clin. N. Am.: Equine Pract.*, 22:437-479, ix.
70. Fekety, R., Shah, A.B. (1993). Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* colitis. *JAMA*, 269:71–5.
71. Fernandes, K.A., Kittelmann, S., Rogers, C.W., Gee, E.K., Bolwell, C.F., Bermingham, E.N., Thomas, D.G. (2014). Faecal microbiota of forage fed horses in New Zealand and the population dynamics of microbial communities following dietary change. *PLoS One* 9, e112846.
72. Figueroa-Quintanilla, D., Salazar-Lindo, E., Sack, B., León-Barúa, R., Sarabia-Arce, S., Campos-Sánchez, M., Eyzaguirre-Maccan, E. (1993). A controlled trial of Bismuth Subsalsalicylate in infants with acute watery diarrheal disease. *The New England Journal of Medicine*, 328:1653-1658.

73. Frape, D. (1998). *Equine nutrition and feeding*. 2^a edición. London: Blackwell Science Ltd.
74. Garner, H.E., Moore, J.N., Johnson, J.H., Clark, L., Amend, J.F., Tritschler, L.G., Coffmann, J.R., Sprouse, R.F., Hutcheson, D.P., Salem, C.A. (1978). Changes in caecal flora associated with onset of laminitis. *Equine Vet J*, 10:249-52.
75. Garrett, L.A., Brown, R., Poxton, I.R. (2002). A comparative study of the intestinal microbiota of healthy horses and those suffering from equine grass sickness. *Vet. Microbiol.*, 87:81-88.
76. Glass, P.J., White, L.J., Ball, J.M., Leparc-Goffart, I., Hardy, M.E., Estes, M.K., (2000). The Norwalk virus ORF 3 encodes a minor structural protein. *J. Virol.*, 74:6581–6591.
77. Glass, R.I., Parashar, U.D., Estes, M.K. (2009). Norovirus gastroenteritis. *N Engl J. Med.*, 361:1776–1785.
78. Goodson, J., Tyznik, W.J., Cline, J.H., Dehority, B.A. (1988). Effects of an abrupt diet change from hay to concentrate on microbial numbers and physical environment in the cecum of the pony. *Appl Environ Microbiol*, 54:1946-50.
79. Gorbach, S.L. (1990). Bismuth therapy in gastrointestinal diseases. *Gastroenterology*, 99:863-875.
80. Graham, D.Y., Estes, M.K., Gentry, L.O. (1983). Double-blind comparison of Bismuth subsalicylate and placebo in the prevention and treatment of enterotoxigenic *Escherichia coli*–induced diarrhea in volunteers. *Gastroenterology*, 85:1017–22.
81. Graham, D.Y., Klein, P.D., Opekun, A.R., Smith, K.E., Polasani, R.R., Evans, D.J. Jr., Evans, D.G., Alpert, L.C., Michaletz, P.A., Yoshimura, H.H., *et al.* (1989). *In vivo* susceptibility of *Campylobacter pylori*. *Am J Gastroenterol*, 84:233–8.
82. Gronvold, A.M., L’Abee-Lund, T.M., Strand, E., Sorum, H., Yannarell, A.C., Mackie, R.I. (2010). Fecal microbiota of horses in the clinical setting: potential effects of penicillin and general anesthesia. *Vet. Microbiol.*, 145:366-372.
83. Gryboski, J.D., Hillmeir, A.C., Grill, B., Kocoshis, S. (1985). Bismuth subsalicylate in the treatment of chronic diarrhea of childhood. *Am J Gastroenterol*, 80:871-876.
84. Gryboski, J.D., Kocoshis, S. (1990). Effect of Bismuth subsalicylate on chronic diarrhea in childhood: a preliminary report. *Rev Infect Dis*, 12:Suppl 1:S36-S40.
85. Gruenheid, S., Finlay, B.B. (2003). Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. *Nature*, 422(6933):775-81.

86. Gustafsson, A., Baverud, V., Gunnarsson, A., Pringle, J., Franklin, A. (2004). Study of faecal shedding of *Clostridium difficile* in horses treated with penicillin. *Equine Vet J*, 36(2):180-2.
87. Gustafsson, A., Baverud, V., Gunnarsson, A., Rantzien, J.H., Lindholm, A., Franklin, A. (1997). The association of erythromycin ethylsuccinate with acute colitis in horses in Sweden. *Equine Vet J*, 29(4): 314-8.
88. Gutierrez, G., Reines, H.D., Wulf-Gutierrez, M.E. (2004). Clinical review: hemorrhagic shock. *Crit. Care* 8, 373-381.
89. Hartmann, F.A., West, S.E. (1995). Antimicrobial susceptibility profiles of multidrug-resistant *Salmonella anatum* isolated from horses. *J Vet Diagn Invest*, 7(1):159-61.
90. Hartmann, F.A., Callan, R.J., McGuirk, S.M., West, S.E. (1996). Control of an outbreak of salmonellosis caused by drug-resistant *Salmonella anatum* in horses at a veterinary hospital and measures to prevent future infections. *J Am Vet Med Assoc*, 209(3):629-31.
91. Hartnack, A.K., Van Metre, D.C., Morley, P.S. (2012). *Salmonella enterica* shedding in hospitalized horses and associations with diarrhea occurrence among their stablemates and gastrointestinal-related illness or death following discharge. *J Am Vet Med Assoc*, 240:726-33.
92. Hird, D.W., Pappaioanou, M., Smith, B.P. (1984). Case-control study of risk factors associated with isolation of *Salmonella* Saint-Paul in hospitalized horses. *Am J Epidemiol*, 120(6):852-64.
93. Hird, D.W., Casebolt, D.B., Carter, J.D., Pappaioanou, M., Hjerpe, C.A. (1986). Risk factors for salmonellosis in hospitalized horses. *J Am Vet Med Assoc*, 188(2):173-7.
94. Hogenauer, C., Hammer, H.F., Krejs, G.J., Reisinger, E.C. (1998). Mechanisms and management of antibiotic-associated diarrhea. *Clin Infect Dis*, 27:702-10.
95. Hosgood, G. (1990). Pharmacologic features and physiologic effects of dopamine. *J Am Vet Med Assoc*, 197:1209-11.
96. House, J.K., Mainar-Jaime, R.C., Smith, B.P., House, A.J. Kamiya, D.Y. (1999). Risk factors for among nosocomial *Salmonella* infection among hospitalized horses. *J Am Vet Med Assoc*, 214(10):1511-6.
97. Huang, Y.C. (2005). Monitoring oxygen delivery in the critically ill. *Chest*, 128: 554S-560S.

98. Ikeda, J.S., Hirsh, D.C. (1985). Common plasmid encoding resistance to ampicillin, chloramphenicol, gentamicin, and trimethoprim-sulfadiazine in two serotypes of *Salmonella* isolated during an outbreak of equine salmonellosis. *Am J Vet Res*, 46(4):769–73.
99. Jang, S.S., Hansen, L.M., Breher, J.E., Riley, D.A., Magdesian, K.G., Madigan, J.E., Tang, Y.J., Silva, J. Jr., Hirsh, D.C. (1997). Antimicrobial susceptibilities of equine isolates of *Clostridium difficile* and molecular characterization of metronidazole-resistant strains. *Clin Infect Dis*, 25(Suppl):S266–7.
100. Jiang, X., Wang, M., Graham, D.Y., Estes, M.K. (1992). Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J. Virol.*, 66:6527–6532.
101. Jiang, X., Wang, M., Wang, K., Estes, M.K., (1993). Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology*, 195:51–61.
102. Johnston, R., Kamstra, L., Kohler, P. (1970). Mares' milk composition as related to 'foal heat' scours. *J. Anim. Sci.*, 31:549-553.
103. Jones, M.L., Ganopoulosky, J.G., Martoni, C.J., Labbe, A., Prakash, S. (2014). Emerging science of the human microbiome. *Gut. Microbes*, 5:446-457.
104. Jones, R.L. (2000). Clostridial enterocolitis. *Vet. Clin. N. Am.: Equine Pract.*, 16:471-485.
105. Jones, S.L. (2004). Inflammatory diseases of the gastrointestinal tract causing diarrhea. En: Reed, S.M., Bayly, W.M., Sellon, D.C. (Editores). *Equine internal medicine*. 2ª edición. (pp. 884-913). St. Louis (MO): Elsevier.
106. Julliand, V., de Fombelle, A., Drogoul, C., Jacotot, E. (2001). Feeding and microbial disorders in horses: part 3. Effects of three hay:grain ratios on microbial profile and activities. *J Equine Vet Sci*, 21(11):543-6.
107. Karcher, L.F., Dill, S.G., Anderson, W.I., Jing, J.M. (1990). Right dorsal colitis. *J Vet Intern Med*, 4:347–53.
108. Kenney, W.C. (1982). Acetaldehyde adducts of phospholipids. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 6, 412-416.
109. Kim, L.M., Morley, P.S., Traub-Dargatz, J.L., Salman, M.D., Gentry-Weeks, C. (2001). Factors associated with *Salmonella* shedding among equine colic patients at a veterinary teaching hospital. *J Am Vet Med Assoc*, 218:740–8.
110. Kobayashi, Y., Koike, S., Miyaji, M., Hata, H., Tanaka, K. (2006). Hindgut microbes, fermentation and their seasonal variations in Hokkaido native horses compared to light horses. *Ecol Res*, 21(2):285-91.

111. Kohnke, J., Kelleher, F., Trevor-Jones, P. (1999). *Feeding horses in Australia, a guide for horse owners and managers*. Canberra, ACT, Australia: Union Offset.
112. Konturek, S.J., Brzozowski, T., Drozdowicz, D., Garlicki, J., Majka, J., Pytko-Polonczyk, J. (1991). Role of acid milieu in the gastroprotective and ulcer-healing activity of sucralfate. *Am. J. Med.* 91, 20S-29S.
113. Kreimeier, U. (2000). Pathophysiology of fluid imbalance. *Crit. Care.* 4 Suppl. 2, S3-7.
114. Lambert, J.R. (1991). Pharmacology of bismuth-containing compounds. *Rev. Infect. Dis.*, 13:S691-S695.
115. Lambert, J.R., Midolo, P. (1997). The actions of bismuth in the treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther*, 11(suppl 1):27-33.
116. Lawler, J.B., Hassel, D.M., Magnuson, R.J., Hill, A.E., McCue, P.M., Traub-Dargatz, J.L. (2008). Adsorptive effects of di-tri-octahedral smectite on *Clostridium perfringens* alpha, beta, and beta-2 exotoxins and equine colostral antibodies. *Am. J. vet. Res.*, 69:233-239.
117. Lawson, G.H.K., Gebhart, C.J. (2000). Proliferative enteropathy. *J Comp Pathol*, 122:77-100.
118. Lerang, F., Moum, B., Ragnhildstveit, E., Sandvei, P.K., Tolas, P., Whist, J.E., Henriksen, M., Haug, J.B., Berge, T. (1998). Simplified 10-day bismuth triple therapy for cure of *Helicobacter pylori* infection: Experience from clinical practice in a population with a high frequency of metronidazole resistance. *Am J Gastroenterol*, 93:212-6.
119. Lumeng, L.J. (1978). The role of acetaldehyde in mediating the deleterious effect of ethanol on pyridoxal 5'-phosphate metabolism. *Clin. Invest.*, 62:286-293.
120. Lyerly, D.M., Lockwood, D.E., Richardson, S.H., Wilkins, T.D. (1982). Biological activities of toxins A and B of *Clostridium difficile*. *Infect Immun*, 35:1147-50.
121. Lyons, E.T., Drudge, J.H., Tolliver, S.C. (2000). Larval cyathostomiasis. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 16(3):501-13.
122. MacAllister, C.G., Morgan, S.J., Borne, A.T., Pollet, R.A. (1993). Comparison of adverse effects of phenylbutazone, flunixin meglumine, and ketoprofen in horses. *J Am Vet Med Assoc*, 202:71-7.
123. Macintire, D.K., Drobatz, K.J., Haskins, S.C., Saxon, W.D. (2005). *Manual of small animal emergency and critical care*. (pp. 71-88). Baltimore (MD): Lippincott Williams & Wilkins.

124. Mackie, R.I., Wilkins, C.A. (1988). Enumeration of anaerobic bacterial microflora of the equine gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol*, 54:2155–60.
125. Maczulak, A.E., Dawson, K.A., Baker, J.P. (1985). Nitrogen utilization in bacterial isolates from the equine cecum. *Appl Environ Microbiol*, 50(6): 1439-43.
126. Madewell, B.R., Tang, Y.L., Jang, S., Madigan, J.E., Hirsh, D.C., Gumerlock, P.H., Silva, J. Jr. (1995). Apparent outbreaks of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in horses in a veterinary medical teaching hospital. *J Vet Diagn Invest*, 7:343–6.
127. Magdesian, K.G., Hirsh, D.C., Jang, S.S., Hansen, L.M., Madigan, J.E. (2002). Characterization of *Clostridium difficile* isolates from foals with diarrhea: 28 cases (1993-1997). *J Am Vet Med Assoc*, 220(1):67-73.
128. Magdesian, K.G., Smith, B.P. (2002). Diarrhea: En: Smith, B.P. (Editor). *Large animal internal medicine*. 3ª edición. (pp.102-8). St. Louis (MO): Mosby, 102-8.
129. Magdesian, K. (2003). Nutrition for critical gastrointestinal illness: feeding horses with diarrhea or colic. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 19(3):617-44.
130. Magdesian, K.G. (2005). Neonatal Foal Diarrhea. *Vet Clin Equine*, 21:295-312.
131. Magdesian, K.G., Dujowich, M., Madigan, J.E., Hansen, L.M., Hirsh, D.C., Jang, S.S. (2006). Molecular characterization of *Clostridium difficile* isolates from horses in an intensive care unit and association of disease severity with strain type. *J Am Vet Med Assoc*, 228(5):751-5.
132. Mainar-Jaime, R.C., House, J.K., Smith, B.P., Hird, D.W., House, A.M., Kamiya, D.Y. (1998). Influence of fecal shedding of *Salmonella* organisms on mortality in hospitalized horses. *J Am Vet Med Assoc*, 213(8):1162–6.
133. Mallicote, M., House, A., Sanchez, L.C. (2012). A review of foal diarrhea from birth to weaning. *Equine Veterinary Education*, 2042-3292.
134. Manhart, M.D. (1990). *In vitro* antimicrobial activity of Bismuth subsalicylate and other bismuth salts. *Rev Infect Dis*, 12:Suppl 1:S11-S15.
135. Matsuda, Y., Baraona, E., Salaspuro, M., Lieber, C.S. (1979). Effects of ethanol on liver microtubules and Golgi apparatus. Possible role in altered hepatic secretion of plasma proteins. *Lab. Invest.*, 41:455-463.
136. Matsuda, N., Hattori, Y. (2006) Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): molecular pathophysiology and gene therapy. *J. Pharmacol. Sci.*, 101:189-198.
137. Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.*, 5:607–625.

138. McConnico, R.S., Morgan, T.W., Williams, C.C., Hubert, J.D., Moore, R.M. (2008). Pathophysiologic effects of phenylbutazone on the right dorsal colon in horses. *J Am Vet Med Assoc*, 69(11):1496-505.
139. McCracken, T.O., Kainer, R.A., Spurgeon, T.L. (1999). The horse. En: McCracken, T.O., Kainer, R.A., Spurgeon, T. (Editores). *Spurgeon's color atlas of large animal anatomy: the essentials*. (pp. 16). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
140. McGorum, B.C., Dixon, P.M., Smith, D.G.E. (1998). Use of metronidazole in equine acute idiopathic toxaemic colitis. *Vet Rec*, 142:635–8.
141. McGorum, B.C., Pierie, R.S. (2009). Antimicrobial associated diarrhoea in the horse. Part 1: Overview, pathogens and risk factors. *Equine Veterinary Education*, 21(11) 610-616.
142. Mertz-Nielsen, A., Steenberg, P., Neumark, T., Bukhave, K., Rask-Madsen, J. (1991). Colloidal bismuth subcitrate causes sustained release of gastric mucosal prostaglandin E2. *Aliment Pharmacol Ther*, 5:127–33.
143. Meschter, C.I., Gilbert, M., Krook, L., Maylin, G., Corradino, R. (1990). The effects of phenylbutazone on the intestinal mucosa of the horse: a morphological, ultrastructural and biochemical study. *Equine Vet J*, 22:255–63.
144. Milinovich, G.J., Trott, D.J., Burrell, P.C., Croser, E.L., Al Jassim, R.A.M., Morton, J.M., van Eps, A.W., Pollitt, C.C. (2007). Fluorescence *in situ* hybridization analysis of hindgut bacteria associated with the development of equine laminitis. *Environ. Microbiol*, 9:2090-2100.
145. Moore, B.E., Dehority, B.A. (1993). Effects of diet and hindgut fermentation on diet digestibility and microbial concentrations in the cecum and colon in the horse. *J Anim Sci*, 71:3350-8.
146. Morris, D.D., Whitlock, R.H., Corbeil, L.B. (1986). Endotoxemia in horses: protection provided by antiserum to core lipopolysaccharide. *Am J Vet Res*, 47:544–50.
147. Moses, V.S., Bertone, A.L. (2002). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 18:21–37.
148. Mott, J., Rikihisa, Y., Zhang, Y., Reed, S.M., Yu, C.Y. (1997). Comparison of PCR and culture to the indirect fluorescent-antibody test for diagnosis of Potomac horse fever. *J. Clin. Microbiol.*, 35:2215-2219.
149. Murray, M.J. (1986). *Salmonella*: virulence factors and enteric salmonellosis. *J Am Vet Med Assoc*, 189(2):145-7.

150. Murray, M.J. (1988). Digestive physiology of the large intestine in adult horses. Part II. Pathophysiology of colitis. *Compend Cotin Educ Pract Vet*, 10:1309-16.
151. Murray, M.J., Doran, R.E., Pfeiffer, C.J., Tyler, D.E., Moore, J.N., Sriranganathan, N. (1989). Comparative effects of cholera toxin, *Salmonella typhimurium* culture lysate, and viable *Salmonella typhimurium* in isolated colon segments in ponies. *Am J Vet Res*, 50(1):22-8.
152. Murray, M.J. (2002). Salmonellosis. En: Brown, C.M., Bertone, J.J. (Editores). *The 5-minute veterinary consult equine*. (pp. 940-1). Baltimore (MD): Lippincott Williams & Wilkins.
153. Nelson, B.B., Lordan, E.E., Hassel, D.M. (2013). Risk factors associated with gastrointestinal dysfunction in horses undergoing elective procedures under general anaesthesia. *Equine Vet. J.*, 45:8-14.
154. Oguz, O., Sariisik, S. B. (2000). Swelling behavior of poly(acrylamide-co-sodium acrylate) hydrogels in aqueous salt solutions: Theory versus experiments. *Eur. Polym. J.*, 36:393–399.
155. Ohl, M.E., Miller, S.I. (2001). *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annu Rev Med*, 52:259–74.
156. Oliveira, C.J., Carvalho, L.F., Garcia, T.B. (2006). Experimental airborne transmission of *Salmonella agona* and *Salmonella typhimurium* in weaned pigs. *Epidemiol Infect.*, 134(1):199–209.
157. Oliver, O.E., Stämpfli, H. (2006). Acute diarrhea in the adult horse: Case example and review. *Vet Clin Equine*, 22:73-84.
158. Optiphen Ashland consultado el día 1 de octubre de 2017 en la página <https://www.ulprospector.com/es/eu/PersonalCare/Detail/4989/25858/Optiphen>
159. Owen, R.A., Fullerton, J., Barnum, D.A. (1983). Effects of transportation, surgery, and antibiotic therapy in ponies infected with *Salmonella*. *Am J Vet Res*, 44(1):46–50.
160. Palmer, J.E. (1993). Potomac horse fever. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 9(2):399–410.
161. Papich, M.G. (2003). Antimicrobial therapy for gastrointestinal disease. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 19:645-63.
162. Pare, J., Carpenter, T.E., Thurmond, M.C. (1996). Analysis of spatial and temporal clustering of horses with *Salmonella krefeld* in an intensive care unit of a veterinary hospital. *J Am Vet Med Assoc*, 209(3):626–8.

163. Patel, M.M., Widdowson, M.A., Glass, R.I., Akazawa, K., Vinje, J., Parashar, U.D. (2008). Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis*, 14:1224–1231. PMC2600393.
164. Perkins, G.A., den Bakker, H.C., Burton, A.J., Erb, H.N., McDonough, S.P., McDonough, P.L., Parker, J., Rosenthal, R.L., Wiedmann, M., Dowd, S.E., Simpson, K.W. (2012). Equine stomachs harbor an abundant and diverse mucosal microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78:2522-2532.
165. Phillips, R.H., Whitehead, M.W., Lacey, S., Champion, M., Thompson, R.P.H., Powell, J.J. (2000). Solubility, Absorption, and Anti-*Helicobacter pylori* Activity of bismuth subnitrate and colloidal bismuth subcitrate: *In vitro* data do not predict *in vivo* efficacy. *Helicobacter*, 5(3):176-182.
166. Pickering, L.K., Feldman, S., Ericsson, C.D., Cleary, T.G. (1981). Absorption of salicylate and bismuth from a Bismuth subsalicylate-containing compound (Pepto-Bismol). *J Pediatr.*, 99:654-656.
167. Plumb, D.C. (1995). *Veterinary drug handbook*. 2ª edición. (pp. 84-5). Ames: Iowa State University Press.
168. Plumb, D.C. (2008). *Veterinary Drug Handbook*. 6ª edición. (pp. 102-103). Blackwell Publishing Professional.
169. Powell, D.G., Donahue, M., Ferris, K., Osborne, M., Dwyer, R. (1988). An epidemiological investigation of equine salmonellosis in central Kentucky during 1985 and 1986. En: Powell, D.G. (Editor). *Equine infectious diseases V: Proceedings of the 5th International Conference*. (pp. 231-5). Lexington (KY): The University Press of Kentucky.
170. Prescott, J.F., Staempfli, H.R., Barker, I.K., Bettoni, R., Delaney, K. (1988). A method for reproducing fatal idiopathic colitis (colitis X) in ponies and isolation of a clostridium as a possible agent. *Equine Vet. J.*, 20:417-420.
171. Prewett, E.J., Luk, Y.W., Fraser, A.G., Lam, W.M., Pounder, R.E. (1992). Comparison of one-day oral dosing with three bismuth compounds for the suppression of *Helicobacter pylori* assessed by 13C-urea breath test. *Aliment Pharmacol Ther*, 6:97–102.
172. Proudman, C.J., Hunter, J.O., Darby, A.C., Escalona, E.E., Batty, C., Turner, C. (2014). Characterisation of the faecal metabolome and microbiome of Thoroughbred racehorses. *Equine Vet. J.*, 47:580-586.

173. Pugh, S., Lewin, M.R. (1990). Mechanism of action of bismuth subnitrate (Roter) in patients with duodenal ulcer disease and healthy volunteers. *J Gastroenterol Hepatol*, 5:382-6.
174. Radicke, S., Kienzle, E., Meyer, H. (1991). Pre-ileal apparent digestibility of oats and corn starch and consequences for cecal metabolism. (p. 43-48.). En: Proc. 12th Equine Nutr. and Physiol. Soc. Symp. Savoy, IL.
175. Raedsch, R. (1991). Wismut therapie in der gastroenterologie. *Deutsch Med. Woch.*, 116:821-824 (1991).
176. Raisbeck, M.F., Holt, G.R., Osweiler, G.D. (1981). Lincomycin-associated colitis in horses. *J Am Vet Med Assoc*, 179(4):362-3.
177. Rankin, S.C., Whichard, J.M., Joyce, K., Stephens, L. O'shea, K., Aceto, H., Munro, D.S., Benson, C.E. (2005). Detection of bla(SHV) extended-spectrum beta-lactamase in *Salmonella enterica* serovar Newport MDR-AmpC. *J Clin Microbiol*, 43(11):5792-3.
178. Reece, W.O. (1997). Digestion and absorption. En: Reece, W.O. (Editor). *Physiology of domestic animals*. 2ª edición. (pp. 270-311). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
179. Reid, S.W., Mair, T.S., Hillyer, M.H., Love, S. (1995). Epidemiological risk factors associated with a diagnosis of clinical cyathostomiasis in the horse. *Equine Vet J*, 27:127-30.
180. Rice, D.H., Hancock, D.D., Roozen, P.M., Szymanski, M.H., Scheenstra, B.C., Cady, K.M., Besser, T.E., Chudek, P.A. (2003). Household contamination with *Salmonella enterica*. *Emerg Infec Dis*, 9(1):120-122.
181. Rikihisa, Y., Reed, S.M., Sams, R.A., Gordon, J.C., Pretzman, C.I. (1990). Serosurvey of horses with evidence of equine monocytic erlichiosis. *J Am Vet Med Assoc*, 197:1327-32.
182. Roine, R.P., Salmela, K.S., Hooknidanne, J., Kosunen, T.U., Salaspuro, M. (1992). Colloidal bismuth subcitrate and omeprazole inhibit alcohol dehydrogenase mediated acetaldehyde production by *Helicobacter pylori*. *Life Sci*. 51(21):PL195-120.
183. Roine, R.P., Sillanaukee, P., Itala, L., Salmela, K.S., Methuen, T., Matysiak-Budnik, T., Salaspuro, M. (1993). Binding of acetaldehyde to rat gastric mucosa. *Scand. J. Gastroenterol.*, 28(197):72.
184. Rowe, R.C., Sheskey, P.J., Quinn, M.E. (Editores). (2009). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6ª edición. London: Pharmaceutical Press.

185. Salaspuro, M. (1994). *Helicobacter pylori* alcohol dehydrogenase. *Toward a Molecular Basis of Alcohol Use and Abuse*, 185–195.
186. Scantlebury, C.E., Pinchbeck, G.L., Clegg, P.D., *et al.* (2008). *Case-control study investigating risk factors for nosocomial diarrhea in horses*. (pp. 43-4). En: 9th International Equine Colic Research Symposium. Liverpool, UK.
187. Scarpignato, C., Pelosini, I. (1999). Bismuth compounds for eradication of *Helicobacter pylori*: Pharmacology and safety. *Prog Basic Clin Pharmacol*, 11:87–127.
188. Schwartzkopf-Genswein, K.S., Beauchemin, K.A., Gibb, D.J., Crews, D.H., Hickman, D.D., Streeter, M., McAllister, T.A. (2003). Effect of bunk management on feeding behaviour, ruminal acidosis and performance of feedlot cattle: a review. *J Anim Sci*, 81:E149-58.
189. Schiller, L.R. (2000). Diarrhea. *Med Clin North Am*, 84:1259-74.
190. Schoster, A., Arroyo, L.G., Staempfli, H.R., Weese, J.S. (2013). Comparison of microbial populations in the small intestine, large intestine and feces of healthy horses using terminal restriction fragment length polymorphism. *BMC Res. Notes*, 6: 91.
191. Schott, H.C., Ewart, S.L., Walker, R.D., Dwyer, R.M., Eberhart, S.W., Kusey, J., Stick, J.A., Derksen, F.J. (2001). An outbreak of salmonellosis among horses at a veterinary teaching hospital. *J Am Vet Med Assoc*, 218(7):1152-9.
192. Seahorn, J.L., Seahorn, T.L. (2003). Fluid therapy in horses with gastrointestinal disease. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 19:665–79.
193. Simpson, J.M., McCracken, V.J., Gaskins, H.R., Mackie, R.I., (2000). Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA amplicons to monitor changes in fecal bacterial populations of weaning pigs after introduction of *Lactobacillus reuteri* strain MM53. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:4705–4714.
194. Simpson, J.M., Martineau, B., Jones, W.E., Ballam, J.M., Mackie, R.I. (2002). Characterization of fecal bacterial populations in canines: effects of age, breed and dietary fiber. *Microb. Ecol.*, 44:186–197.
195. Slomiany, B.L., Piotrowski, J., Slomiany, A. (1992). Effect of sucralfate on the degradation of human gastric mucus by *Helicobacter pylori* protease and lipases. *Am J Gastroenterol*, 87:524–9.
196. Smith, B.P., Reina-Guerra, M., Hardy, A.J. (1978). Prevalence and epizootiology of equine salmonellosis. *J Am Vet Med Assoc*, 172(3):353–6.

197. Smith, B.P., Reina-Guerra, M., Hardy, A.J., Habasha, F. (1979). Equine salmonellosis: experimental production of four syndromes. *Am J Vet Res*, 40(8): 1072-7.
198. Smith, B.P. (1981). Equine salmonellosis: a contemporary view. *Equine Vet J*, 13(3):147-51.
199. Smith, B.P. (1981). Salmonellosis infection in horses. *Compend Contin Educ Pract Vet*, 3(Suppl):S4-13.
200. Songer, J.G. (1996). Clostridial enteric disease of domestic animals. *Clin Microbiol Rev*, 9:216-34.
201. Soriano-Brücher, H., Avendano, P., O’Ryan, M., Braun, S.D., Manhart, M.D., Balm, T.K., Soriano, H.A. (1991). Bismuth subsalicylate in the treatment of acute diarrhea in children: a clinical study. *Pediatrics*, 87:18-27.
202. Sorrell, M.F., Tuma, D.J. (1985). Hypothesis: alcoholic liver injury and the covalent binding of acetaldehyde. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 9(4):306-309.
203. Southwood, L.L. (2006). Principles of antimicrobial therapy: what should we be using? *Vet Clin North Am Equine Pract*, 22:279-96.
204. Sox, T., Olson, C.A. (1989). Binding and killing of enteropathogenic bacteria by Bismuth subsalicylate. *Antimicrob Agents Chemother*, 33(12):2075-82
205. Spier, S.J., Lavoie, J.P., Cullor, J.S., Smith, B.P., Snyder, J.R., Sisco, W.M. (1989). Protection against clinical endotoxemia in horses by using plasma antibody to Rc mutant *E. coli* (J5). *Circ Shock*, 28:235-48.
206. Spier, S.J. (1993). Salmonellosis. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 9:385-97.
207. Staempfli, H.R., Townsend, H.G., Prescott, J.F. (1991). Prognostic features and clinical presentation of acute idiopathic enterocolitis in horses. *Can Vet J*, 32:232-7.
208. Staempfli, H.R., Prescott, J.F., Brash, M.L. (1992). Lincomycin-induced severe colitis in ponies: association with *Clostridium cadaveris*. *Can. J. vet. Res.*, 56: 168-169.
209. Staempfli, H.R., Prescott, J.F., Carman, R.J. (1992). The etiology and treatment of idiopathic colitis-recent studies. *Proc. Am. Ass. Equine Pract*, 38: 433-9.
210. Steelman, S.M., Chowdhary, B.P., Dowd, S., Suchodolski, J., Janecka, J.E. (2012). Pyrosequencing of 16S rRNA genes in fecal samples reveals high diversity of hindgut microflora in horses and potential links to chronic laminitis. *BMC Vet. Res.*, 8:231.

211. Steffen, R., Mathewson, J.J., Ericsson, C.D., DuPont H.L., Helminger A., Balm, T.K., Wolff, K., Witassek, F. (1988). Travelers' diarrhea in West Africa and Mexico: fecal transport systems and liquid Bismuth subsalicylate for self-therapy. *J Infect Dis.*, 157:1008-1013.
212. Steinhoff, M.C., Douglas, R.G. Jr., Greenberg, H.B., Callahan, D.R. (1980). Bismuth subsalicylate therapy of viral gastroenteritis. *Gastroenterology*, 78:1495-9.
213. Sterns, R.H., Ocdol, H., Schrier, R.W., *et al.* (1994). Hyponatremia pathophysiology, diagnosis and therapy. En: Narins, R.G. (Editor). Maxwell and Kleeman's clinical disorders of fluid and electrolyte metabolism. 5ª edición. (pp.583). New York: McGraw-Hill.
214. Stratton-Phelps, M., Wilson, W.D., Gardner, I.A. (2000). Risk of adverse effects of pneumonic foals treated with erythromycin versus other antibiotics. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 217, 68-73.
215. Sundset, M.A., Edwards, J.E., Cheng, Y.F., Senosiain, R.S., Fraile, M.N., Northwood, K.S., Praesteng, K.E., Glad, T., Mathiesen, S.D., Wright, A.D. (2009). Molecular diversity of the rumen microbiome of Norwegian reindeer on natural summer pasture. *Microb. Ecol.*, 57:335-348.
216. Sweeny, R.W., Hansen, T.O. (1990). Use of a liquid diet as a sole source of nutrition in six dysphagic horses and as a dietary supplement in seven hypophagic horses. *J Am Vet Med Assoc*, 197(8):1030-2.
217. Sykes, B.W., Furr, M.O. (2005). Equine endotoxaemia--a state-of-the-art review of therapy. *Aust. Vet. J.*, 83:45-50.
218. Taha, S., Johansson, O., Jonsson, S.R., *et al.* (2007). Toxin production by and adhesive properties of *Clostridium difficile* isolated from humans and horses with antibiotic-associated diarrhea. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 30:163-74.
219. Tefera, S., Hartlebakk, J.G., Berstad, A. (1999). The effect of *Helicobacter pylori* eradication on gastro-oesophageal reflux. *Aliment Pharmacol Ther*, 13:915-20.
220. Tillotson, K., Savage, C.J., Salman, M.D., Gentry-Weeks, C.R., Rice, D., Fedorka-Cray, P.J., Hendrickson, D.A., Jones, R.L., Nelson, W., Traub-Dargatz, J.L. (1997). Outbreak of *Salmonella infantis* infection in a large animal veterinary teaching hospital. *J Am Vet Med Assoc*, 211(12):1554-7.
221. Tillotson, K., Traub-Dargatz, J.L. (2003). Gastrointestinal protectants and cathartics. *Vet Clin Equine*, 19:599-615.

222. Traub-Dargatz, J.L., Salman, M.D., Jones, R.L. (1990). Epidemiologic study of *Salmonella* shedding in the feces of horses and potential risk factors of development of the infection in hospitalized horses. *J Am Vet Assoc*, 196(10):1617-22.
223. Traub-Dargatz, J.L., Garber, L.P., Fedorka-Cray, P.J., Ladely, S., Ferris, K.E. (1999). Fecal shedding of *Salmonella* spp by horses in the United States during 1998 and 1999 and detection of *Salmonella* spp in grain and concentrate sources on equine operations. *J Am Vet Med Assoc*, 217:226–30.
224. Traub-Dargatz, J.L., Dargatz, D.A., Morley, P.S., Dunowska, M. (2004). An overview of infection control strategies for equine facilities with an emphasis on veterinary hospitals. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 20(3):507–20.
225. Turner, N.C., Martin, G.P., Marriott, C. (1985). The influence of native porcine gastric mucus gel on hydrogen ion diffusion: the effect of potentially ulcerogenic agents. *J Pharm Pharmacol*, 37:776–80.
226. VICH GL4 (Stability 2) – Stability Testing for New Veterinary Dosage Forms. Consultada el día 2 de octubre en la página <http://www.vichsec.org/guidelines/pharmaceuticals/pharma-quality/pharma-stability.html>
227. Vollaard, E.J., Clasener, H.A.L. (1994). Colonization resistance. *Antimic. Agents Chemother*, 38:409-414.
228. Ward, M.P., Brady, T.H., Couetil, L.L., Liljebjelke, K., Maurer, J.J., Wu, C.C. (2005). Investigation and control of an outbreak of salmonellosis caused by multidrug-resistant *Salmonella typhimurium* in a population of hospitalized horses. *Vet Microbiol*, 107(3–4):233–40.
229. Ward, R.L., Sander, D.S., Knowlton, D.R. (1985). *In vitro* activities of bismuth salts against rotaviruses and other enteric viruses. *Antimicrob Agents Chemother*, 27:306-8.
230. Weese, J.S., Staempfli, H.R., Prescott, J.F. (2000). Isolation of environmental *Clostridium difficile* from a veterinary teaching hospital. *J Vet Diagn Invest*, 12: 449–52.
231. Weese, J.S., Staempfli, H.R., Prescott, J.F. (2000). Survival of *Clostridium difficile* and its toxins in equine feces: implications for diagnostic test selection and interpretation. *J Vet Diagn Invest*, 12(4):332–6.
232. Weese, J.S., Baird, J.D., Poppe, C., Archambault, M. (2001). Emergence of *Salmonella typhimurium* definitive type 104 (DT104) as an important cause of salmonellosis in horses in Ontario. *Can Vet J*, 42:788–92.

233. Weese, J.S., Staempfli, H.R., Prescott, J.F. (2001). A prospective study of the roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in equine diarrhea. *Equine Vet J*, 33(4):403-9.
234. Weese, J.S., Kaese, H., Baird, J.D., *et al.* (2002). Suspected ciprofloxacin-associated colitis in 4 horses. *Equine Vet Educ*, 4:232-7.
235. Weese, J.S., Cote, N.M., DeGannes, R.V.G. (2003). Evaluation of *in vitro* properties of di-tri-octahedral smectite on clostridial toxins and growth. *Equine Vet J*, 35:638-41.
236. Weese, J.S., Holcombe, S.J., Embertson, R.M., Kurtz, K.A., Roessner, H.A., Jalali, M., Wismer, S.E. (2014). Changes in the faecal microbiota of mares precede the development of postpartum colic. *Equine Vet. J.*, 47(6):641-9. doi: 10.1111/evj.12361
237. White, G., Prior, S.D. (1982). Comparative effects of oral administration of trimethoprim/sulphadiazine or oxytetracycline on fecal flora of horses. *Vet Rec*, 111:316-8.
238. Whitehead, M.W., Powell, J.J., Champion, M., Lacey, S., Thompson, R.P.H. (1993). Non-absorbable bismuth (Roter) is as effective as Denol in eradicating *H. pylori*. *Gut*, 34(suppl 4):S45.
239. Whitehead, M.W., Thompson, R.P.H., Powell, J.J. (1996). Regulation of metal absorption in the gastrointestinal tract. *Gut*, 39:625-8.
240. Willing, B., Voros, A., Roos, S., Jones, C., Jansson, A., Lindberg, J.E. (2009). Changes in faecal bacteria associated with concentrate and forage only diets fed to horses in training. *Equine Vet. J.*, 41:908-914.
241. Wiström, J., Norrby, S.R., Myhre, E., Eriksson, S., Granstrom, G., Lagergren, L., Englund, G., Nord, C.E., Svenungsson, B. (2001). Frequency of antibiotic-associated diarrhoea in 2462 antibiotic-treated hospitalized patients: a prospective study. *J. Antimicrob. Chemother*, 47:43-50.