

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS
Y BIOTECNOLÓGICAS**

PROGRAMA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**“OBTENCION DE UNA MEZCLA DE BACTERIAS GLICOLITICAS
PROCEDENTES DEL COLON DE PACIENTES CON ENFERMEDAD
INFLAMATORIA INTESTINAL, A FIN DE FACILITAR EL COLON
TARGETING EN EL TRATAMIENTO ORAL DE LAS ENFERMEDADES
INFLAMATORIAS INTESTINALES A BASE DE PELLETS
RECUBIERTOS DEL ACIDO 5-AMINO SALICILICO”**

AREQUIPA -2013

PRESENTADO POR:

**FABIOLA NATALÍ GARCÍA
FERNÁNDEZ**

**PARA OPTAR EL TITULO
PROFESIONAL DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO**

ASESOR:

**DR. GONZALO DÁVILA DEL
CARPIO**

**AREQUIPA – PERÚ
2013**

DEDICATORIA

Dedico este proyecto de tesis a Dios y a mis padres. A Dios porque ha estado conmigo a cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar, a mis padres, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento. Depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba sin dudar ni un solo momento en mi inteligencia y capacidad. Es por ellos que soy lo que soy ahora.



AGRADECIMIENTOS

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial a la PhD. Christelle Neut, directora de esta investigación, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continua de la misma, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de estos meses.

Especial reconocimiento merece el interés mostrado por mi trabajo y las sugerencias recibidas de los profesores Mgter. Gonzalo Dávila del Carpio y QF. Mercedes Jave Márquez, con quienes me encuentro en deuda por el ánimo infundido y la confianza depositada.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a mis compañeras del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Lille 2 por su amistad y su colaboración

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de mi familia y amigos.

A todos ellos, muchas gracias.

RESUMEN

El propósito de este estudio fue encontrar una mezcla bacteriana para ser utilizada en la reproducibilidad de un método in vitro eficaz con el fin de probar un sistema de entrega de drogas al colon por medio de la degradación enzimática de su flora. Este desarrollo bacteriano in vitro busca ser la herramienta sustituta de las muestras fecales de los pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

Con este propósito se expusieron pellets del ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), recubiertos con un 15% de una mezcla de polímeros Dextrina (Nutriosa): Etilcelulosa 1:4, a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal superior antes de ser introducidos a frascos que contenían medios de cultivo inoculados con muestras fecales frescas o cepas aisladas de bacterias provenientes de estas muestras fecales.

Los perfiles del porcentaje de liberación de fármaco se analizaron para cada una de las muestra con el fin de identificar las bacterias que podrían ser potencialmente utilizadas en combinación para replicar los perfiles producidos utilizando las muestras fecales frescas. Se puede concluir que el uso de los sistemas de entrega de fármacos al colon usando la degradación de enzimas microbianas, tales como los pellets utilizados en este estudio, muestran promesas claras para la efectividad de este método. Sin embargo, la producción de una mezcla bacteriana representante con el fin de reemplazar el uso de muestras fecales frescas de pacientes con EII requerirá el análisis de un largo número de muestras fecales y muestras aisladas, como se realizó en este estudio.

ABSTRACT

The purpose of this study was to find a bacterial mixture to be used in the reproducibility of an in vitro method for testing an effective colonic drug delivery system by enzymatic degradation of the colonic flora. This in vitro bacterial development aims to be a substitute tool for the faecal samples of patients with Inflammatory Bowel Disease (IBD). 5-aminosalicylic acid (5-ASA) pellets, coated with a 15% polymer mixture (Nutriose: ethylcellulose 1:4), were exposed to simulated conditions of the upper gastrointestinal tract before being introduced into flasks containing culture media inoculated with fresh fecal samples or bacteria strains isolated from these fecal samples. Percentage drug release profiles were analyzed for each sample in order to identify the bacteria that could potentially be used in combination to replicate the profiles produced using fresh fecal samples. The results showed variations in the content of fecal bacteria among patients and consequently these variations were also found in the release profiles. Isolated bacteria samples showed positive profiles of drug release, nevertheless from the number of samples analyzed is difficult to establish which one has the most similar profile to the fecal samples. Can be concluded that the use of colonic drug delivery systems using microbial enzymes degradation such as pellets used in this study show strong promise for the search of the effectiveness of this method. However, the production of representative bacterial mixture in order to replace the use of fresh fecal samples from patients with IBD will need the analysis of a large number of faecal samples and samples isolated, completed in this study.

TERMINOS ABREVIADOS

TERMINOS	ABREVIATURAS
Enfermedad Inflamatoria Intestinal	E.I.I.
Colitis Ulcerosa	C.U.
Enfermedad de Crohn	E.C.
Colitis Indeterminada	C.I.
Tracto Gastrointestinal	T.G.I.
Acido 5-Amino Salicílico	5-ASA
Azatioprina	AZA
Mercaptopurina	MP
Cáncer Colorrectal	CCR
Unidad Formadora de Colonias	UFC
Too much to count/ Muchas para contar	TMTC

INDICE

	Página
INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS.....	2
HIPOTESIS.....	3
CAPITULO I: MARCO TEÓRICO	
1. Enfermedades Inflammatorias Intestinales.....	4
1.1. Colitis Ulcerosa.....	5
1.2. Enfermedad de Crohn.....	7
1.3. Colitis Indeterminada.....	9
1.4. Epidemiología de las EII.....	10
1.5. Etiología de las EII.....	12
1.6. Manifestaciones Extraintestinales.....	14
1.7. Flora Intestinal.....	15
1.7.1. Escherichia Coli.....	19
1.7.2. Bifidobacterium.....	21
1.7.3. Bacteroides Ovatus.....	23
1.7.4. Ruminococcus.....	24
1.8. Tratamiento Farmacológico.....	26
1.8.1. Aminosalicilatos.....	26
1.8.2. Corticoides.....	31
1.8.3. Inmunomoduladores.....	34
1.9. Complicaciones: Cáncer de Colon.....	36
2. Targeting Drugs dirigidas al colon.....	37
2.1. Principios de Targeting Drugs dirigidas al colon.....	37
2.2. Mecanismos de las Targeting drugs dirigidas al colon.....	37
2.2.1. Sistema pH-dependiente.....	37
2.2.2. Sistema dependiente del tiempo de tránsito.....	38

2.2.3. Sistema dependiente de la flora bacteriana del colon.....	39
2.2.4. Sistema de presión controlada.....	40
2.3. Antecedes de Investigación.....	41
2.3.1. Estudios In Vitro.....	41
2.3.2. Estudios In Vivo.....	41

CAPITULO II: MATERIALES Y METODOS

1. Muestras.....	43
2. Equipos y Materiales.....	43
2.1. Equipos.....	43
2.2. Materiales.....	44
2.3. Medios de cultivo.....	44
2.4. Reactivos.....	45
3. Metodología.....	45
3.1. Simulación del TGI (Estomago e Intestino Delgado).....	46
3.2. Simulación del Intestino Grueso (Colon).....	47
3.3. Análisis Bacteriano.....	49
3.4. Identificación Bacteriana.....	51
3.5. Cuantificación del Principio Activo por HPLC.....	54

CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSION

1. Resultados.....	56
2. Discusión.....	78

CONCLUSIONES.....83

ANEXOS.....84

REFERENCIAS.....108

INTRODUCCION

Las “targeting drugs” orientadas al colon se han convertido en una herramienta útil para el tratamiento de muchas enfermedades, incluido el tratamiento de las Enfermedades Inflammatorias Intestinales (EII), como la Enfermedad de Crohn y la Colitis Ulcerosa.

En el tratamiento de las EII se utiliza la mesalazina o Acido 5Amino Salicílico el cuál administrado por vía oral usando una forma farmacéutica convencional, se desintegra rápidamente en el contenido estomacal, liberándose y absorbiéndose la droga en el torrente sanguíneo.

Esto permitiría alcanzar concentraciones sistémicas elevadas, conllevando a un aumento de los efectos colaterales y a una concentración baja en el sitio específico, que en el caso de las EII es el colon.

Esto se puede sobrellevar si la liberación de la droga no se da en el estómago ni en el intestino delgado, sino en el colon. Para este objetivo, existen sistemas que modifican el tiempo de latencia de la droga, actuando sobre el pH, la presión, el tiempo de vaciado gástrico y la flora intestinal, con lo que se trabajó en esta investigación.

La investigación propuesta busca, mediante la aplicación de la teoría y los conceptos básicos descritos, mejorar el tratamiento oral de las EII y de esta manera facilitar la liberación del principio activo y mejorar la calidad de vida del paciente.

Existe la posibilidad de que a través de este proyecto se dé un acercamiento para facilitar la entrega de drogas al colon y así, mejorar el tratamiento oral de las enfermedades inflamatorias intestinales que hasta el día de hoy, no viene mejorando.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar las bacterias o mezclas bacterianas que sean capaces de liberar la mesalazina (5-ASA) a partir de pellets recubiertos con polímeros a través de su fermentación o degradación.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Identificar la flora bacteriana del colon a partir de muestras fecales de pacientes con EII.
- Aislar las bacterias glicolíticas de la flora bacteriana del colon para investigar su impacto sobre la degradación de los pellets de 5ASA.
- Cuantificar la liberación del principio activo gracias a la degradación causada por bacterias glicolíticas.
- Comparar la liberación del principio activo dada por las bacterias aisladas y las bacterias en consorcio.

HIPÓTESIS

Dada la actividad glicolítica de las bacterias del colon, es posible que degraden la asociación de los polímeros Dextrina: Etilcelulosa de los pellets que contienen el Acido 5 Aminosalicílico, para así liberar el principio activo en el sitio de acción.

CAPITULO I

MARCO TEORICO

1. ENFERMEDADES INFLAMATORIAS INTESTINALES

Las EII engloban a 3 entidades principales: La Enfermedad de Crohn, la Colitis Ulcerosa y la Colitis indeterminada. Las tres de etiología aún no definida, con patrones clínicos que muestran fases de actividad inflamatoria alternadas con períodos de remisión, pudiendo observarse compromiso multisistémico con cierta frecuencia.

Cada una de ellas presenta características diferentes pero comparten un proceso inflamatorio del tracto gastrointestinal, una presentación clínica variada, un curso crónico y una etiopatogenia desconocida, siendo la teoría más aceptada la desregulación de la respuesta inmune del huésped frente a su misma flora bacteriana o a agentes externos.

La EC, la CU y la CI son tres entidades que a pesar de ser diferentes entre sí, tienen características comunes que en muchas ocasiones hacen difícil su diagnóstico.

Para hacer su diagnóstico diferencial es necesario apoyarse en las características clínicas, endoscópicas, radiológicas, histológicas, serológicas y evolutivas de la enfermedad a lo largo del tiempo. (Tabla 1)

Los síntomas y la gravedad de cada una de estas enfermedades dependerán de la extensión, la localización, el grado de actividad inflamatoria y de las manifestaciones extraintestinales que se detallaran a lo largo del proyecto. ^{2, 6, 27.}

TABLA 1:

DIFERENCIAS ENTRE LA COLITIS ULCEROSA Y LA ENFERMEDAD DE CROHN

<i>Colitis ulcerosa</i>	<i>Enfermedad de Crohn</i>
Afección de recto	Afecta recto con menor frecuencia
Mayor o menor extensión colon	Cualquier segmento de boca a ano
Afectación en continuidad y simétrica	Afectación segmentaria y asimétrica
Afectación mucosa	Afectación transmural
Engrosamiento capa muscular	“Envoltura grasa”
No habitual estenosis, ni fístulas	Desarrollo de fístulas y estenosis
Rara enfermedad perianal	Enfermedad perianal
Raros abscesos	Abscesos intraabdominales
Pérdida patrón vascular, edema, úlceras	Úlceras serpinginosas, empedrado
Histología:	Histología:
- Abscesos en criptas	- Granulomas
- Lesiones continuas	- Lesiones discontinuas
- Distorsión arquitectura	- Fibrosis
- Depleción de mucina	- Agregados linfoides

Fuente: Mendoza.

1.1. Colitis Ulcerosa (C.U.)

La C.U. es un tipo de EII crónica que afecta de forma difusa a la mucosa del colon, como se ve en la Figura 1. Su curso es típicamente recurrente, con exacerbaciones que alternan con periodos de completa remisión. Su riesgo relativo de muerte es de 2,4 durante el primer año.

La inflamación habitualmente comienza en el recto y se extiende continuamente hacia el ciego deteniéndose en la válvula ileocecal. La severidad de la sintomatología a menudo se correlaciona con la extensión anatómica de la enfermedad.

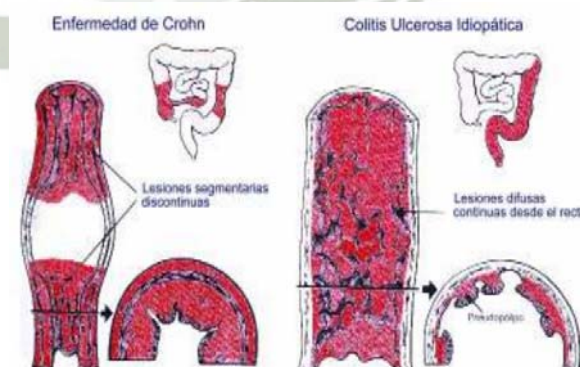


Figura 1: Diferencia entre la CU y la EC. Tomada de Medina

La colitis ulcerosa se presenta de cuatro formas diferentes con las siguientes

manifestaciones clínicas:

- Presentación Inicial: precedida por un episodio de rectorragia.
- Enfermedad Leve: Rectorragia intermitente(4 ó menos deposiciones al día); hemoglobina > 10.5 g/L; Raros casos de fiebre, dolor y pérdida de peso
- Enfermedad Moderada: Rectorragia mayor (más de 4 deposiciones al día); Anemia leve; Dolor; Febrícula.
- Enfermedad Severa: Cólicos abdominales, fiebre en torno a $39,5^{\circ}\text{C}$, pérdida de peso, rectorragia(más de 10 deposiciones al día)

En la CU, las lesiones son más intensas en el recto y se extienden a lo largo del colon aunque se han presentado excepciones a esta regla.

La afectación intestinal es continua, a diferencia con la EC en la que es discontinua.

La característica histológica de la CU es que el proceso inflamatorio se limita a la mucosa y gracias a esto es excepcional la aparición de fistulas, estenosis o engrosamientos transmurales, como ocurre en la EC.

Otra característica que ayuda a su diagnostico es la presencia de neutrófilos en la pared de las criptas. (Fig. 2). Sin embargo los datos que mejor ayudan son los que indican cronicidad como son la deformación arquitectónica y la atrofia de las criptas con presencia de agregados linfoides basales e infiltrado inflamatorio crónico, todo ello asociado a la disminución de moco.

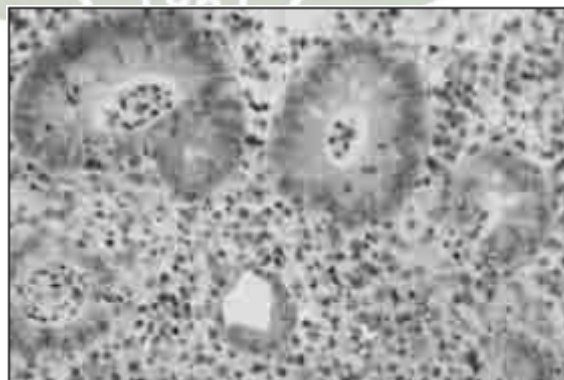


Figura 2: Presencia de neutrófilos, propio de la C.U. Tomado de Geboes.

Los síntomas típicos que se observan en la CU son fundamentalmente los derivados de la afección de la mucosa del colon: rectorragia, diarrea, tenesmo, urgencia, dolor y otros síntomas asociados como la fiebre, la pérdida de peso y el malestar general. ^{2, 6, 27, 35.}

1.2. Enfermedad de Crohn (E.C.)

La EC es un tipo de EII crónica que puede afectar a cualquier zona del tracto digestivo, desde la boca hasta el ano, como se puede apreciar en la imagen 1. Las áreas que presentan la enfermedad con mayor frecuencia son el íleon terminal y el ciego pero puede afectar raramente al recto e incluso a la orofaringe. Con frecuencia la EC no afecta al recto, aspecto diferenciado con la CU.

La EC presenta habitualmente una inflamación asimétrica y segmentaria, lo que significa que existen áreas del intestino preservadas de la enfermedad entre los segmentos del intestino que están afectados y que tienen una longitud variable.

La EC es una enfermedad transmural, afectando todo el espesor de la pared incluyendo a la grasa mesentérica, la cual rodea parcialmente al intestino. Este fenómeno se conoce como “Envoltura de Grasa” y es específico para la EC.

Al presentar una afección transmural puede tener como complicación la aparición de fistulas (comunicaciones anormales entre la luz del intestino y el mesenterio), abscesos intraabdominales y estenosis (estrechamiento de la luz del intestino debido a una inflamación). (Fig. 3a)

La característica histológica clave en la EC es el hallazgo de granulomas, células inmunes. (Fig.3b)

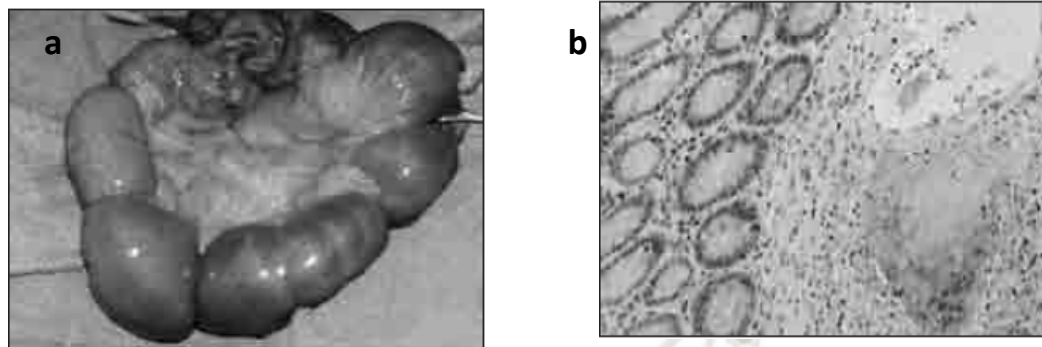


Figura 3: “Envoltura de grasa”(a), y hallazgo de granulomas (b) propio de la E.C. Tomado de Geboes

Según la clasificación de Montreal, la EC es clasificada en función a la edad (A), la localización (L) y el comportamiento de la enfermedad (B). (Tabla 2)

En el caso de la edad (A) se subdivide en tres categorías: menores de 16 años (A1), entre 17 y 40 años (A2) y mayores de 40 años (A3).

De acuerdo a la localización (L) se subdivide en cuatro categorías: Localización ileal (L1) presente en el tercio distal del íleon con manifestaciones fundamentales debidas a la presencia de estenosis como vómitos, náuseas, dolor, pérdida de peso y fiebre. Localización cólica (L2) presente entre el recto y el ciego, con manifestaciones propias como la diarrea abundante, hematoquecia, enfermedad perianal y manifestaciones comunes como la pérdida de peso y el dolor. Localización Ileocólica (L3) afectando no solo el íleon terminal sino también otra área del colon desde el recto hasta el colon ascendente. Sus manifestaciones son una mezcla de la L1 y la L2. Localización gastrointestinal alta (L4) cuando afecta cualquier localización proximal al íleon distal (Íleon proximal, yeyuno, duodeno, estomago, esófago y orofaringe). Presenta una clínica variada según su exacta localización como en el caso del esófago que presenta dispepsia, náuseas, vómitos, dolor y hasta hemorragia digestiva alta.

En el caso del yeyuno se relaciona con síntomas como diarrea, pérdida de peso y síndrome de malabsorción.

Finalmente la EC se ve clasificada según el comportamiento de la misma enfermedad (B), la cual muestra tres diferentes tipos de comportamiento: Comportamiento inflamatorio (B1) con presencia de úlceras, teniendo síntomas típicos como el dolor y la diarrea. Comportamiento Estenosante (B2) con presencia de estenosis, por consecuencia síntomas como náuseas, vómitos, dolor y distensión abdominal con dificultad para expulsar los gases por el ano. Comportamiento perforante (B3) con presencia de perforaciones, abscesos y fistulas incluida la enfermedad perianal. ^{2, 6, 27, 34,36.}

TABLA 2
CLASIFICACIÓN DE MONTREAL DE LA ENFERMEDAD DE
CROHN.

<i>Edad al diagnóstico (A)</i>		
A1: Menor de 16 años		
A2: 17-40 años		
A3: Mayor de 40 años		
<i>Localización (L)</i>	<i>Modificada por gastrointestinal (GI) alta (L4)</i>	
L1 Íleon terminal	L1 + L4	Íleon terminal + GI alta
L2 Colon	L2 + L4	Colon + GI alta
L3 Íleo-colon	L3 + L4	Íleo-colon + GI alta
L4 GI alta		
<i>Comportamiento (B)</i>	<i>Modificado por enfermedad perianal (p)</i>	
B1 Inflamatorio	B1p	Inflamatorio + perianal
B2 Estenosante	B2p	Estenosante + perianal
B3 Penetrante	B3p	Penetrante + perianal

Fuente: Silverberg.

1.3. Colitis Indeterminada (C.I.)

El concepto de la CI se utiliza de forma habitual pero existe mucha confusión sobre su significado real.

Antiguamente se la consideraba como el paso previo a la determinación de una de las EII (CU y EC), su diagnóstico se ve determinado por la incorporación de la endoscopia, con diferencias clínicas e histológicas.

Típicamente las lesiones endoscópicas observadas no permiten decidir si se trata de una EC o una CU y en el estudio histológico existe una desestructuración de la arquitectura de las criptas e inflamación aguda y crónica que no permite diferenciar entre EC y CU.

Por lo tanto, se considera que la CI es una EII que afecta exclusivamente al colon. Pero la importancia de esta entidad está en que, a pesar de que el tratamiento médico utilizado para la EC y la CU es eficaz en la CI, su curso clínico es peor.

2, 27.

1.4. Epidemiología de las Enfermedades Inflammatorias Intestinales

Existe actualmente una variación geográfica entre los datos de la incidencia de las EII, encontrándose la más alta incidencia en el Hemisferio Norte. (Figura 4). La incidencia de la colitis ulcerosa (CU) se mantiene estable durante la última década, en contraste con la enfermedad de Crohn (EC) que se vio aumentada en el mismo rango de tiempo.

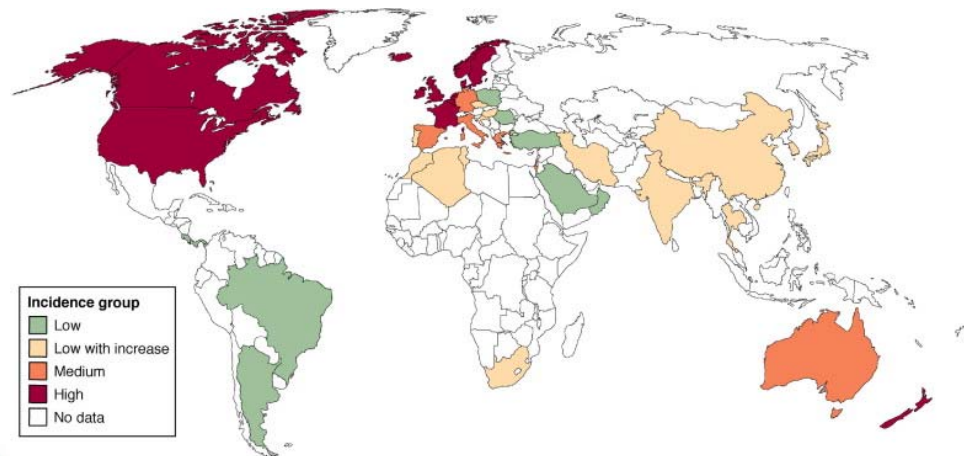


Figura 4: Mapa de la epidemiología de las E.I.I.

tomada de Gomollón

La incidencia anual a nivel mundial de la CU es de 3 a 9 casos por 100 000 habitantes y de la EC de 2 á 4 casos por 100 000. La prevalencia de CU es de 40 por 100 000 y de EC de 20 á 40 por 100 000 habitantes.

La CU en Estados Unidos de Norteamérica muestra una incidencia de 3 á 15 casos por 100 000 al año y una prevalencia de 50 a 80 por 100,000; mientras que en Europa la incidencia es más alta, de 10 a 20 por 100,000 al año y la prevalencia de 100 a 200 por 100 000. En América Latina no se cuenta con información epidemiológica precisa, existiendo datos referenciales en poblaciones pequeñas. Un estudio realizado en Brasil entre los años 1990 y 1999 reportó 257 casos nuevos de EII, de los cuales un 51% correspondió a CU.

En el Perú los estudios publicados son escasos y muestran cifras bastante menores que las reportadas mundialmente, Illescas y col. En 1999 refieren una incidencia de 1,42 casos por año y Vera y col en el 2004 2,1 casos por año, ambos reportes de hospitales de Lima.

La incidencia de EC en Norteamérica y Europa es de aproximadamente 5 a 10 casos por 100 000 al año, con una prevalencia entre 50 a 100 por 100 000. En Latinoamérica un estudio brasilero reportó 146 casos nuevos de EII entre 1990 y el 2002, de los cuales sólo el 11,7% correspondieron a EC. Otro estudio realizado en Puerto Rico en 1996, en pacientes pediátricos, reportó una prevalencia de 41,4 casos por 100 000.

Los estudios de EC en la literatura médica nacional son muy escasos, debido a que esta patología es infrecuente en nuestro país, conociéndose solamente reportes de casos aislados.

En la población pediátrica la edad pico de presentación de EII es entre los 10 y 17 años con un leve predominio del sexo femenino, habiéndose evidenciado en las dos últimas décadas un aumento en la incidencia de EC, mientras que las cifras de CU permanecen estables, tal como sucede en los adultos.

Según Gasull, las EII respecto a la edad presentan un pico de incidencia en la segunda-tercera década seguido de un segundo pico de incidencia, aunque menor, en las últimas décadas de la vida, pero estas enfermedades pueden debutar a cualquier edad. La CU se presenta más frecuentemente entre los 10 y 50 años, mientras que la EC se presenta entre los 20 y 30 años.

La EII tiene un leve predominio del sexo femenino, siendo más frecuente en la raza blanca, población urbana y en los países desarrollados.

Existe también importantes diferencias étnicas, según Gasull, con el porcentaje más alto de incidencia descrito entre las personas de raza blanca y el porcentaje más bajo entre los asiáticos, sin embargo en las últimas dos décadas, la incidencia de EII aumentó en los países asiáticos en casi diez veces. Existen ciertas etnias más susceptibles de desarrollar la enfermedad como los judíos Azkenatzi. ^{27, 32.}

1.5. Etiología de las Enfermedades Inflammatorias Intestinales

Aunque su fisiopatología aún no se conoce con certeza, actualmente se considera que la EII es el resultado de una respuesta inmunológica no regulada, intensa y prolongada frente a un estímulo externo, en pacientes predispuestos genéticamente. En el lumen intestinal existen múltiples antígenos frente a los cuales las células epiteliales desarrollan normalmente cierta tolerancia.

En la EII esto no sucede, desarrollándose una respuesta inmune permanente, predominantemente a través de linfocitos y macrófagos.

Los detalles de esta teoría se están investigando en 4 aspectos básicos:

- Epidemiológicos: en relación a dieta como la ingesta de azúcar y grasas; drogas como los antiinflamatorios no esteroideos; historia de vacunas; variaciones estacionales; y suministro de agua.
- Agentes infecciosos: la inflamación de la mucosa del TGI puede estar producida por algún agente infeccioso. Esta es una hipótesis controvertida ya que no se ha encontrado ningún agente infeccioso como posible agente causal. Actualmente se está investigando sobre la posibilidad de algún virión, virus o micoplasma puedan estar implicados.
- Proceso inflamatorio: anormalidades en la comunicación intercelular, con una cascada inflamatoria amplificada y no regulada. El factor de necrosis tumoral α (FNT α) y las moléculas de adhesión leucocitaria, como las ICAM-1, tendrían un papel preponderante en este proceso.
- Genética asociada a EII: esta asociación es más fuerte en la EC, siendo el gen NOD2 del cromosoma 16 el más estudiado.

Sin embargo, existe una evidencia científica cada día más amplia de que diferentes factores ambientales influyen la aparición de las EII así como en la evolución posterior en su historia natural. Después de los agentes infecciosos y la dieta, el tabaco, la apendicectomía y la toma de anticonceptivos orales son los factores que más frecuentemente se han asociado a la etiología de estas enfermedades.

El más reciente estudio caso-control en este sentido confirma el efecto protector del hecho de fumar en pacientes con CU, así como el elevado riesgo de EC para los fumadores y los que toman anticonceptivos orales (Harries y colaboradores); la apendicectomía previa se asocio a una disminución de riesgo de desarrollar CU pero no EC. (Tabla 3)

TABLA 3:
ASOCIACIÓN DE LOS DIFERENTES FACTORES DE RIESGO
CON LA C.U. Y E.C.

<i>Factores de riesgo</i>	CU	EC
Tabaco		
Fumador	F. protector	F. de riesgo
Exfumador	F. de riesgo	F. protector
No fumador	F. de riesgo	F. protector
Apendicectomía	F. protector	F. protector ???
Anticonceptivos orales	F. riesgo ???	—
Predisposición genética	↑↑	↑
Dieta	Falta evidencia	Falta evidencia
Hábito higiénico	—	F. de riesgo ??
Infecciones	Asociación clara etiología?	Asociación clara etiología?
AINE	Controvertido	Controvertido

Fuente: Aladrén.

Mucho falta todavía para explicar la etiopatología e historia natural de las EII y para esto, es importante la realización de estudios epidemiológicos, poblacionales, con inclusión del mayor número posible de pacientes que permita una atención correcta preventiva y terapéutica. ^{2, 6, 27.}

1.6. Manifestaciones Extraintestinales

La prevalencia de las manifestaciones extraintestinales en las EII, oscila entre el 21 y el 36% de pacientes con EII. La mayoría de estas manifestaciones aparecen en pacientes tanto con CU como con EC, afectando a cualquier órgano o sistema. Los órganos afectados más frecuentes son la piel, las articulaciones, los ojos y el hígado. (Tabla 4).

- Trastornos cutáneos (Eritema nodos), oculares (Uveitis y Escleritis) y articulares (desde artrialgia hasta artritis como espondilitis y sacroileitis).
- Litiasis renal y biliar, uropatía obstructiva y malabsorción intestinal.
- Otras: osteoporosis, enfermedades hepáticas, amiloidosis, alteraciones del sistema vascular, hematológico, pulmonar, cardiológico y neurológico.

Siendo las más frecuentes las manifestaciones articulares y dermatológicas. ^{6, 27.}

TABLA 4:

MANIFESTACIONES EXTRAINTESTINALES MÁS FRECUENTES

<i>Manifestaciones articulares</i>
<ul style="list-style-type: none"> - Artritis centrales: espondilitis anquilosante y sacroileítis - Artritis periféricas: <ul style="list-style-type: none"> • Tipo I: pauciarticular, asimétrica, de grandes articulaciones, se asocia a la actividad de la enfermedad, no destrucción articular • Tipo II: poliarticular, simétrica, grandes articulaciones, no se asocia a la actividad. Aparece destrucción articular - Osteopatías hipertróficas: periostosis dolorosas, acropaquias
<i>Manifestaciones oculares</i>
<ul style="list-style-type: none"> - Epiescleritis y escleritis - Uveítis
<i>Manifestaciones cutáneas</i>
<ul style="list-style-type: none"> - Eritema nodoso - Pioderma gangrenoso
<i>Manifestaciones hepatobiliares</i>
<ul style="list-style-type: none"> - Pericolangitis y colangitis esclerosante - Esteatosis - Cirrosis biliar primaria

Fuente: Gonzales

1.7. Flora Intestinal

Se estima que cada individuo alberga unos 100 billones de bacterias de unas 400 especies distintas. Más del 95% de esta población de bacterias vive en el tracto digestivo, sobre todo en el colon. La figura 5 nos muestra las principales bacterias que albergan el TGI.

El intestino humano es el habitat natural de una población numerosa, diversa y dinámica de microorganismos, principalmente bacterias, pero también virus, levaduras y archeas, que se han adaptado a la vida en superficies mucosas o en la luz del intestino.

El ecosistema microbiano del intestino incluye especies nativas adquiridas al nacer y una serie variable de microorganismos que transitan temporalmente por el TGI, adquiridas por ingestión de alimentos, bebidas, etc.

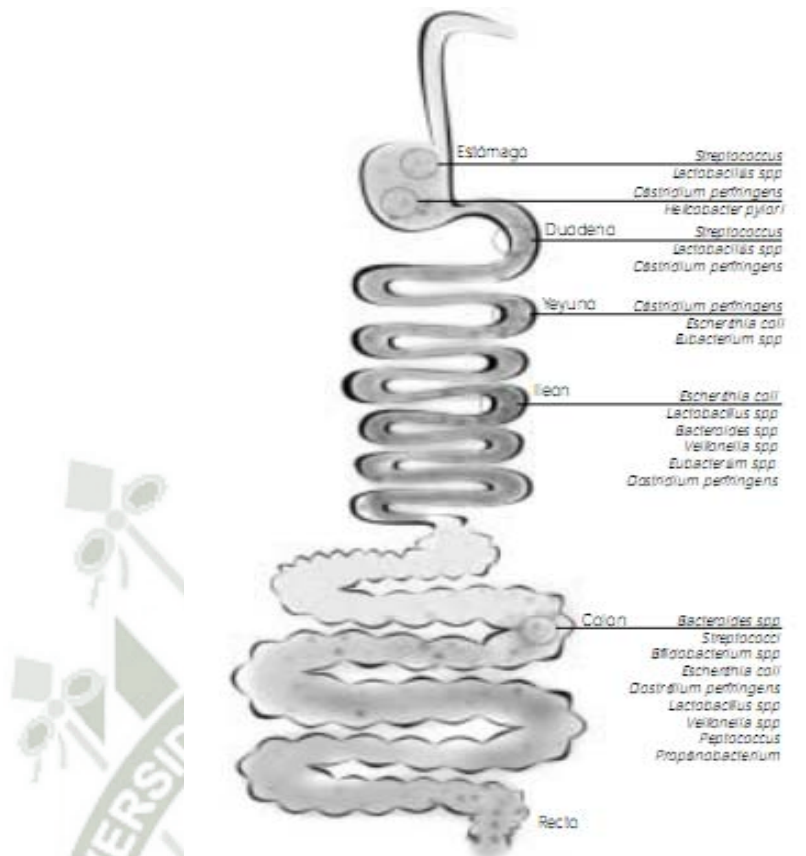


Figura 5: Principales bacterias que alberga el T.G.I.

En la zona del colon encontramos $10^{11} - 10^{12}$ bacterias/ 1ml de muestra. Esta flora bacteriana es predominantemente anaerobia de naturaleza y secretora de enzimas que son capaces de metabolizar sustratos como los carbohidratos y proteínas que escapa de la digestión del TGI alto.

En el colon existe una flora dominante constituida por: bacterioides, eubacterias, bifidobacterias y peptostreptococos y una flora satélite formada por: enterobacterias, estreptococos y lactobacilos. El desarrollo de una flora residual constituida por gérmenes oportunistas que pueden causar enfermedad si disminuyen los mecanismos de defensa intestinal o por determinados gérmenes patógenos, dan lugar a un desequilibrio en el ecosistema y a la aparición de enfermedad. (Tabla 5) ^{3, 27}.

TABLA 5

BACTERIAS DOMINANTES EN EL COLON HUMANO.

Anaerobios	Anaerobios facultativos (aerobios)
Bacteroides Bifidobacterium Clostridium Eubacterium Lactobacillus Peptostreptococcus Peptococcus Porphyromonas Ruminococcus	Enterococcus Escherichia coli Enterobacteriaceae (otras bacterias que no son E. coli) Staphylococcus

Fuente: Konemam

La composición de la flora bacteriana es variable de un individuo a otro, pero sus funciones metabólicas son menos diversas. La flora del colon humano es como un órgano de intensa actividad metabólica por la acción de enzimas bacterianos sobre sustratos presentes en la luz intestinal. Muchos autores consideran más relevante conocer la actividad enzimática de la flora bacteriana que la variedad de especies que la componen. Las funciones principales de la flora son: 1) fermentación de residuos de la dieta y mucinas endógenas; 2) recuperación de energía mediante la generación de ácidos grasos de cadena corta; 3) protección contra la colonización e invasión de patógenos (efecto barrera), y 4) desarrollo, estimulación y modulación del sistema

Las enfermedades infecciosas están causadas por agentes microbianos específicos que poseen la capacidad de transmitir la enfermedad a los individuos susceptibles. Se ha demostrado que las EII no son enfermedades infecciosas sin embargo, la presencia de bacterias en la luz y las mucosas del intestino es una condición sine qua non en la patogenia de las lesiones crónicas del intestino asociadas a EII. En estos pacientes existe una respuesta inmune exagerada frente a las bacterias de la microbiota habitual. Se ha demostrado que existe una sensibilización del sistema inmune frente a elementos de la propia microbiota, con hiperreactividad linfocitaria y producción de Ig G, en contraste con la normalidad de tolerancia a las bacterias residentes y producción de Ig A. Para explicar esta reactividad anormal del sistema inmune existen diversos factores como la susceptibilidad genética, defectos en la barrera mucosa intestinal y/o desequilibrios en la comunidad

bacteriana del ecosistema del TGI.

Diversos estudios mostraron diferencias entre la microbiota intestinal normal y la de los pacientes con EII. Según Neut et al. (Tabla 6) existen diferencias significativas entre ambas microbiotas, en particular en el caso de las concentraciones del *Bifidobacterium* y *E. Coli*, las cuales presentan mayores concentraciones en las muestras fecales de los pacientes sanos comparado con aquellas muestras de los pacientes con EII.

En contraste, las muestras fecales de pacientes con EII contienen *E. Coli* lactosa negativa, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* y *oxytoca* y *Enterobacter cloacae*, las cuales no se encontraron en las muestras fecales de pacientes sanos.

Además, existe diferencia fundamental en la calidad y cantidad de la microflora.

14, 16, 24, 26, 30.



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

1961

TABLA 6
DIFERENCIAS ENTRE LA MICROBIOTA INTESTINAL NORMAL Y LA DE
LOS PACIENTES CON E.I.I.

Fuente: Neut

	Healthy subjects	Crohn's Disease	Ulcerative Colitis
Number	10	11	5
Mean age	40+/- 15	32+/- 12	36+/- 20
Columbia blood agar			
Mean total counts [log UFC/g]	9.88+/- 0.48	9.15+/- 1.30	9.88+/- 0.57
Number of strains	28	34	14
Mean	2.8	3.1	2.8
Anaerobes			
Bacteroides	9	10	3
Prevotella	2	2	2
Fusobacterium	3	3	2
Veillonella	0	0	1
Clostridium	0	5	1
Bifidobacterium	9	3	1
Other Gram + rods	3	2	2
Gram + cocci	1	2	0
Aerobes			
Enterobacteria	1	3	2
Escherichia coli	1	2	1
Citrobacter freundii	0	1	1
Lactobacillus	0	2	0
Streptococcus	0	2	0
McConkey agar			
Mean counts	6.30+/- 1.19	7.16+/- 1.48	8.01+/- 1.06
Number of strains	10	14	7
Escherichia coli	10	6	4
E. coli lac-	0	1	0
Citrobacter freundii	0	3	1
Klebsiella pneumoniae	0	1	1
Klebsiella oxytoca	0	2	0
Enterobacter cloacae	0	1	0
Other Gram - rods	0	0	1

1.7.1. Escherichia Coli

i. Características

Bacilo GRAM negativo perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, anaerobio facultativo, móvil gracias a sus flagelos periticos, no forma esporas, capaz de fermentar la glucosa y la lactosa.

La E. Coli tiene como hábitat a la flora normal del intestino de los seres humanos y otros animales, sin embargo también puede habitar el aparato genital femenino.

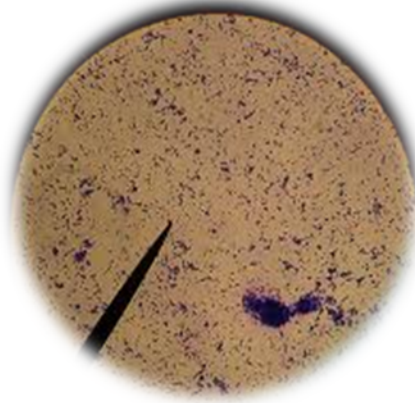


Figura 6: Escherichia Coli (40 x). Tomada en laboratorio de microbiología Universidad Lille II

ii. Identificación

Coloración GRAM: Bacilo GRAM negativo.

Crece con facilidad en medios de laboratorios rutinarios y en medios diferenciales entéricos y en medios selectivos con bilis.

W.W. Profundo: Aerobio Facultativo.

Fermentación de glucosa: positiva

Oxidasa: negativa

Reducción de nitratos: positiva.

Catalasa: positiva.

El medio de cultivo selectivo para las enterobacterias es el Mc Conkey.

La E.Coli presenta en este medio, colonias planas, secas, rosadas con área circundante de color rosa más oscuro compuesto por sales biliares precipitadas.

La identificación completa se basa en reacciones bioquímicas:

En el medio LIA (Agar Hierro Lisina) su reacción es de K/K o K/A es decir que o bien ésta no produce ninguna de las dos reacciones esperadas con este medio, o

bien puede solo se puede dar la descarboxilación. El medio se ve azulado en la parte inclinada y amarillo en el fondo por fermentación de glucosa, o a veces puede presentar amarillo en su totalidad.

En el medio TSI (Agar Hierro Triple Azúcar) su reacción es de A/A es decir que si fermentan la glucosa y la lactosa. Algunas cepas pueden dar como reacción K/A es decir que fermentan la glucosa más no la lactosa.

En la prueba del IMVIC la E. Coli es ++-- es decir Indol y Rojo de Metilo positivo mientras que Voges Proskauer y Citrato de Simmons negativo

iii. **Patogenia**

Su modo de transmisión varía con el tipo de infección. En el caso de las infecciones no gastrointestinales, los microorganismos pueden ser endógenos o diseminarse de persona a persona, sobretodo en el ámbito hospitalario.; en el caso de las infecciones gastrointestinales, involucra la diseminación fecal-oral entre seres humanos a través de alimentos o agua contaminados o consumo de carne mal cocida o leche de ganado bovino contaminado.

La E. Coli como causante de infecciones extraintestinales presenta como factor de virulencia sus endotoxinas, su producción de capsula y pili. Siendo las infecciones extraintestinales mas comunes: las infecciones urinarias, bacteriemia, las infecciones nosocomiales.

La E.Coli enterotoxigénica (ETEC) presenta factores de virulencia como la producción de pili y sus toxinas termolábiles y termoestables que median la secreción de agua y electrolitos hacia la luz intestinal. La enfermedad más común de esta especie es la diarrea del viajero y de la infancia.

La E.Coli enteroinvasiva (EIEC) presenta factores de virulencia dudosos y parecidos a los de la Shigella. Esta causa disentería es decir necrosis, ulceración e inflamación del intestino grueso.

La E. Coli enteropatógena (EPEC) presenta de igual manera la formación de pili en racimos, intimina y otros factores que causan la perdida de las microvellosidades del intestino. La diarrea en los lactantes es causada por esta

clase de Escherichia.

La E. Coli enterohemorrágica (EHEC) presenta una toxina similar a la de la Shigella.

Esta causa síntomas como la inflamación y colitis hemorrágica.

La E.Coli enteroagregante probablemente involucra adherencia por medio del pili y toxinas y hemolisinas, lo cual causa la diarrea acuosa. ^{5, 7, 25.}

1.7.2. Bifidobacterium

i. Características

Bifidobacterium es un género de bacterias GRAM positivas anaerobias, inmóviles y con frecuencia ramificadas. Es un género de bacterias saprofitas de la flora intestinal, las bacterias que residen en el colon.

Ayudan a la digestión y están asociadas con una menor incidencia epidemiológica de alergias y también previenen algunas formas de crecimientos de tumores, algunas bacterias de esta especie se usan como probióticos.

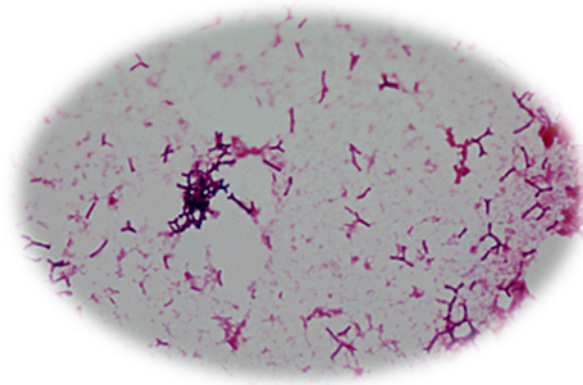


Figura 7: Bifidobacterium (40X) Tomada en laboratorio de microbiología
Universidad Lille II

ii. Identificación

En la tinción GRAM: Bacilos GRAM+, se colorean de manera irregular y tiene

formas variadas, algunos curvos y en forma de clava; a menudo ramificados.
Dispuestos en forma aislada, en pares y a veces aparecen como cadenas en empalizadas de células paralelas o rosetas. No forman esporas
W.W. profundo: Anaerobios estrictos.
Fermentación de Glucosa: +
Catalasa negativo.
No encapsulados.
Temperatura de Crecimiento: 37-41°C
No son ácido-alcohol resistentes.
Reducción de los nitratos negativa
Urea: positiva

iii. Patogenia

No se conocen factores de virulencia definitivos.
No se los encuentra con frecuencia en las muestras clínicas. Por lo común se hallan en infecciones mixtas de pelvis o abdomen.
Por el contrario, es usado como agente probiótico. Considerado una bacteria “amigable”.
Utilizado en bastantes condiciones que afectan a los intestinos como diarrea infantil, diarrea de viajero. Otros de sus usos incluyen tratamiento en enfermedades de la piel llamada eczema, candidiasis, gripes, mastitis, hepatitis, intolerancia a la lactosa, cáncer, etc.
Su principal uso es mejorar el sistema inmune y ayuda a bajar el colesterol.^{5, 7, 25.}

1.7.3. Bacteroides Ovatus

i. Características

Bacteroides es un género de bacterias GRAM negativas con forma de bacilo.

Anaerobias estrictas, no formadoras de esporas e inmóviles.

Estas bacterias son normalmente comensales, constituyendo el principal componente de la microbiota gastrointestinal, vaginal y bucal de los mamíferos.

Pueden también crecer en azúcares simples cuando están disponibles, pero su principal fuente de energía son los polisacáridos de origen vegetal.

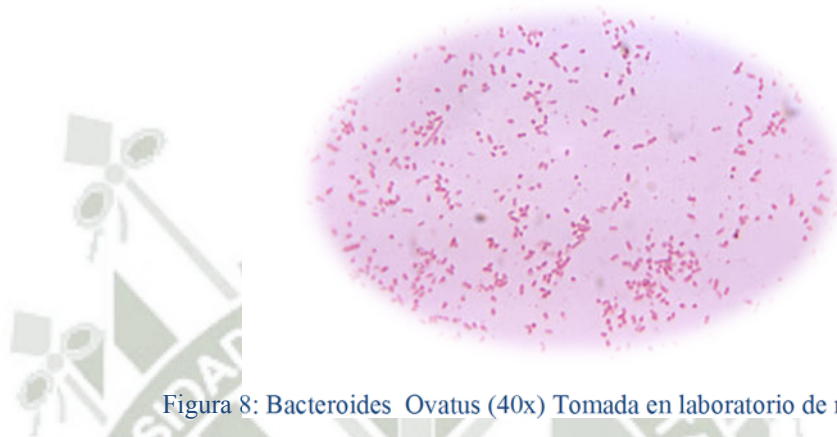


Figura 8: Bacteroides Ovatus (40x) Tomada en laboratorio de microbiología
Universidad Lille II

ii. Identificación

GRAM: Bacilos GRAM negativos

W.W. Profundo: Anaerobio estricto

Fermentación de glucosa: positiva

Catalasa: positiva

Oxidasa: negativa

Reducción de nitrato: positiva

H₂S: positiva

Lactosa, Arabinosa, Maltosa, Ramnosa, Ribosa, Sacarosa y Xilosa: Positivo.

Glicerol: negativo

Indol: positivo

Hidrólisis de la Esculina: positiva.

Gelatina: positiva.

Almidón: positiva.

Urea: negativa

iii. Patogenia

Microorganismos de esta familia como *Bacteroides fragilis*, *gracilis* o *ureolyticus* que por sus endotoxinas pueden causar infecciones anaerobias.

Estas infecciones son mixtas con otros microorganismos anaerobios. Estas infecciones aparecen en cualquier parte del cuerpo, por lo común como lesiones localizadas o en abscesos cerrados y pueden afectar el cráneo, periodoncio, tórax, peritoneo, hígado y aparato genital femenino. Produciendo bacteriemia, neumonía, artritis, sinusitis, ulcera e infecciones de tejidos blandos.

En el caso del *Bacteroides fragilis* causan generalmente infecciones por debajo del diafragma.^{5, 7, 25.}

1.7.4. Ruminococcus

i. Características

Organismos GRAM positivos inmóviles con forma de cocos. Bacteria anaerobia que se encuentra normalmente en el intestino humano. Fermenta la glucosa y no produce esporas.

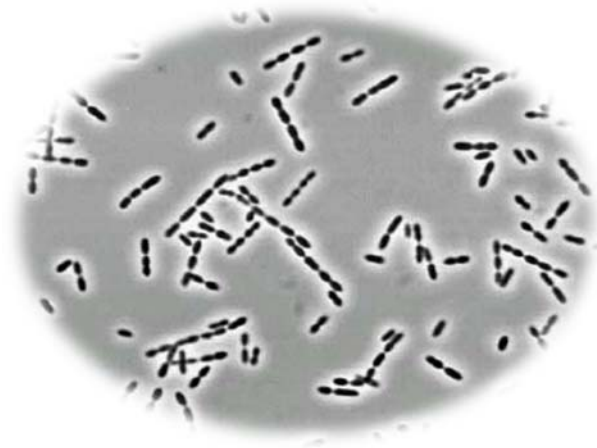


Figura 9: Ruminococcus (40x) Tomada en laboratorio de microbiología Universidad Lille II

ii. Identificación

GRAM: Cocos GRAM positivo.

W.W. Profundo: anaerobio estricto.

Glucosa, Manosa, Sacarosa, Maltosa, Lactosa: Positivo.

Arabinosa, Xilosa, Ribosa, Ramnosa, Fructuosa, Galactosa: Negativo.

Gas: Positivo.

Indol: Negativo.

Nitrato: Negativo.

Gelatina: Negativo.

Almidón: Negativo.

Glucógeno: Negativo.

Inulina: Negativo.

Glicerol: Negativo.

Manitol: Negativo.

Esculina: Negativo.

iii. Patogenia

Además del intestino humano, esta bacteria habita en el lumen intestinal de los bovinos, ovejas y cabras. No son patógenas. Estos organismos permiten a sus

anfitriones la digestión de la celulosa. Actualmente es un área importante de estudio. ^{5, 7, 25.}

1.8. Tratamiento Farmacológico de EII

El tratamiento de las EII tiene que ser determinado fundamentalmente por la gravedad de las manifestaciones clínicas y su extensión anatómica.

El objetivo principal es la obtención de una mayor eficacia, mediante la inducción de remisión, la prevención de recidivas, la mejora de la calidad de vida y la obtención de la curación de la mucosa, con el mínimo riesgo posible (reducción de los efectos adversos y de las complicaciones).

Se sabe que el tratamiento no farmacológico también es necesario para mejorar el bienestar del paciente (dietas, terapias para disminuir el dolor, etc.)

Antes de iniciar el tratamiento, el médico debe evaluar bien al paciente, con una historia clínica completa que incluya la edad de inicio, la duración, la extensión y el curso de la enfermedad, los medicamentos previos y actuales, la respuesta a cada intervención, las cirugías previas y el estado actual de los síntomas. Adicionalmente, debe tener tránsito intestinal y colonoscopia reciente, para definir la extensión, severidad y descartar complicaciones.

El tratamiento farmacológico actual comprende el uso de tratamiento antiinflamatorio (Aminosalicilatos y corticoides) e inmunomoduladores (Tiopurinas, Metotrexato, Azatioprina, etc.) los cuales pueden tener doble vía de administración; oral y tópica. ^{8, 13, 27, 28.}

1.8.1. AMINOSALICILATOS

Los aminosalicilatos son fármacos que contienen en su estructura la molécula del Acido 5 Aminosalicílico (5-ASA o mesalazina) son uno de los principales agentes en el tratamiento de pacientes con EII.

i. Farmacología y mecanismo de acción

El ácido 5 – Aminosalicílico (5ASA) también llamado mesalazina es un aminosalicilato análogo del ácido acetilsalicílico, base del tratamiento de las EII. Esta molécula pura por vía oral se absorbería en el Intestino delgado proximal y no llegaría alcanzar el colon a concentraciones terapéuticas, en consecuencia estarían presentes los efectos adversos del medicamento sobre el Intestino Delgado.

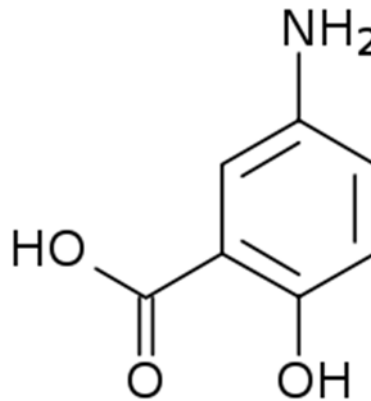


Figura 10: estructura molecular del 5ASA tomada de Dale.

Es por este motivo que la industria farmacéutica ha diseñado diferentes formas de liberación de 5-ASA a nivel intestinal, entre estas:

- a) Las formas conjugadas (Sulfasalazina, olsalazina, balsalazida) profármacos dependientes de la acción de las bacterias azorreductasas del colon. La sulfasalazina contiene 5ASA unido por anillo azo con sulfapiridina, que le sirve de transporte. Cuando se administra por vía oral, no se absorbe a nivel del TGI alto de modo que al llegar al nivel del colon ésta molécula es hidrolizada por las bacterias del colon y se separa el 5-ASA de la sulfonamida. La sulfonamida no tiene ninguna actividad farmacológica para el tratamiento de las EII y sólo es la responsable de los efectos adversos que producen las sulfonamidas como epigastralgia, rash cutáneo, entre otros. Por el contrario, el 5-ASA es el componente que actúa directamente como antiinflamatorio sobre la mucosa intestinal. Estudios en pacientes con EII demostraron que dosis de sulfasalazina de 3-6 g/día son efectivas en paciente con actividad leve a moderada.

- b) Las formulaciones de liberación retardada pH dependientes (recubiertos de un copolímero del ácido metacrílico, Eudragit L o S) indicados en los brotes leves de EC por sus concentraciones adecuadas en el intestino delgado, íleon y colon.
- c) Los preparados de liberación prolongada, microgránulos de 5ASA recubiertos de una membrana semipermeable de etilcelulosa que facilita su liberación independientemente del pH intestinal o de la acción de las enzimas.

TABLA 7
PRINCIPALES COMPUESTOS ORALES DE ÁCIDO 5-AMINOSALICÍLICO (5-ASA)

<i>Nombre comercial</i>	<i>Formulación</i>	<i>Forma de liberación</i>	<i>Lugar de liberación</i>
Lixacol*	Mesalazina encapsulada en Eudragit S	pH luminal > 7	Íleon distal/colon
Asacol microgranular	Mesalazina en forma de microgránulos encapsulada en Eudragit S	pH luminal > 7	Íleon distal/colon derecho
Claversal*, Mesasal, Salofalk*	Mesalazina encapsulada en Eudragit L	pH luminal > 6	Yeyuno/íleon/colon
Rowasa	Mesalazina encapsulada en Eudragit L 100	pH > 6	Yeyuno/íleon/colon
Enterasin	Mesalazina en forma de microgránulos encapsulada en Eudragit S	pH = 7	Íleon distal/colon
Pentasa*	Mesalazina encapsulada en gránulos de etilcelulosa	Dependiente del tránsito	Yeyuno/íleon/colon
Rasal	Olsalazina (dímero de 5-ASA unido con enlace AZO)	Hidrólisis bacteriana	Colon
Salazopirina*	Sulfasalazina (sulfapiridina + 5-ASA unida con enlace AZO)	Hidrólisis bacteriana	Colon
Colazide	Balsalazida (ASA junto a portador inerte unido con enlace AZO)	Hidrólisis enzimática	Colon

Fuente: Gassull

La disponibilidad sistémica del 5ASA absorbido es baja al ser rápidamente metabolizado hacia un metabolito acetilado, la acetil mesalazina, por la enzima N acetil transferasa 1.

Todas las formulaciones de 5-ASA se metabolizan por la misma vía. La acetilación de la mesalazina depende de la dosis, es saturable y parece no estar influenciada por el fenotipo acetilador del paciente.

La farmacocinética de esta molécula es difícilmente determinada puesto que cada formulación tiene un mecanismo de liberación distinto. Tras su administración oral un tercio de 5ASA oral es absorbido y excretado por la orina, mientras que los dos tercios restantes permanecen en el intestino a nivel del íleon distal y colon excretándose por heces. A los 15 minutos de su administración se detecta en el plasma, alcanzándose la concentración plasmática máxima de 1 a 4 horas con una disminución progresiva dejando de ser apreciable a las 12 horas. La curva de la concentración plasmática de su metabolito sigue el mismo patrón, pero con concentraciones superiores y eliminación más lenta.

Después de su administración rectal la absorción es lenta dependiendo de la dosis, la presentación, el pH y el grado de difusión.

El mecanismo de acción exacto de los aminosalicilato es desconocido, mas su eficacia terapéutica se debe a su efecto antiinflamatorio tópico sobre la mucosa intestinal más que a un efecto sistémico. Se sabe que actúa en la cascada del ácido araquidónico incluyendo tanto la vía de la lipooxigenasa como de la ciclooxigenasa, produciendo la inhibición de leucotrienos, la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos, e inhibición de la quimiotaxis de macrófagos y neutrófilos en el tejido inflamado.

TABLA 8

CARACTERÍSTICAS DE LOS AMINOSALICILATOS

CARACTERÍSTICAS DE LOS AMINOSALICILATOS				
	Formulación	Dosis	Administración	Liberación
Sulfasalazopirina Salazopyrina®	Sulfapiridina-5ASA	500 mg	Oral/suposit.	Colon
Mesalazina: 5ASA Claversal®	Eudragit-L	500 mg	Oral/enema/espuma/ suposit.	Yeyuno-Íleon-Colon
Lixacol®	Eudragit-S	400 mg	Oral	Íleon-Colon
Pentasa®	Microgranulosesticelulosa	1 g	Oral	ID-Colon
Rowasa®	Eudragit L100	NC	Oral	Íleon
Anillo Azoico Olsalazina: Rasal®	Dímero 5-ASA	500 mg	Oral	Colon
Balsalazida		NC		
Ipsalazida		NC		
Poly-ASA		NC		

NC: No comercializado.



Fuente: Hinojosa

ii. Indicaciones

La selección de los diferentes preparados de 5 ASA debe basarse en la localización de la enfermedad. En el caso de localización distal del colon el tratamiento de elección sería el tópico (supositorios, enemas, geles). En la colitis extensa será más adecuado el uso de preparados orales de 5ASA. Estos se utilizan en el tratamiento de la C.U. y de la E.C. (afectación colónica) cuando tienen una actividad de leve a moderada. También son utilizados en el tratamiento de las remisiones. Sin embargo, éstos no son tan efectivos como los corticoides en la inducción de las remisiones en EII severa o moderada.

Las pautas del tratamiento con 5-ASA son:

- Colitis Ulcerosa:

Fase Leve-Moderada: Sulfasalazina (Iniciar con 500 mg/día y aumentar hasta 4g/día)

Fase de Remisión: Sulfasalazina (oral/rectal)

- Enfermedad de Crohn:

Fase Leve: Sulfasalazina (Iniciar con 500 mg/día y aumentar hasta 4 /día)

Fase de Remisión: Mesalazina oral.

La duración del tratamiento es usualmente de no más de 6-8 semanas.

Del mismo modo, la dosis por vía oral durante la etapa de remisión de la enfermedad es de 800 mg/2 veces al día.

Aun está en estudio la seguridad y eficacia de este medicamento para niños, lo cual obliga a ser la vía rectal la mejor opción para esta población.

Los preparados orales de 5-ASA de liberación sostenida o pH-dependientes permiten obtener concentraciones adecuadas en el intestino delgado, especialmente en el íleon y colon estando indicados en los brotes leves de la EC de esas localizaciones a dosis elevadas >3gramos.

El uso de los preparados de 5-ASA puede ser eficaz en el mantenimiento de la remisión en los pacientes con CU pero es cuestionable en los pacientes con EC.

iii. Efectos secundarios

Los efectos secundarios presentes en pacientes tratados con aminosalicilatos se dan especialmente con el uso de la sulfasalazina, ya antes descritos, los que obligan a suspender el tratamiento hasta en un 10-20% de las ocasiones. Otros efectos secundarios son las alteraciones hematológicas precoces como leucopenia, pancitopenia, anemia hemolítica y toxicidad renal.

Un aspecto importante descrito en los pacientes tratados con 5ASA es el de la nefrotoxicidad pero es base de estudios ya que algunos de ellos han relacionado estos efectos como propios de la enfermedad misma. Aunque la evidencia soporta la seguridad de los aminosalicilatos a largo plazo sobre la función renal, se recomienda análisis de creatinina en sangre previo al inicio del tratamiento con estos agentes, con monitorización cada 6 meses inicialmente y posterior anual. La

olsalazina, un dímero de 5 ASA produce agravar la diarrea por activar la secreción ileal en algunos pacientes, esta se reduce de forma significativa al administrarlo asociado a la ingesta. Durante el embarazo la mesalazina puede utilizarse de forma segura con una dosis no mayor de 2 g/día, al poder potencialmente desarrollar nefrotoxicidad fetal. ^{1, 12, 31, 33.}

1.8.2. CORTICOIDES

Desde hace varios años los corticosteroides han demostrado su efectividad en controlar la actividad inflamatoria en pacientes con EII, siendo superiores a la sulfasalazina y mesalazina, con un inicio de acción más rápido.

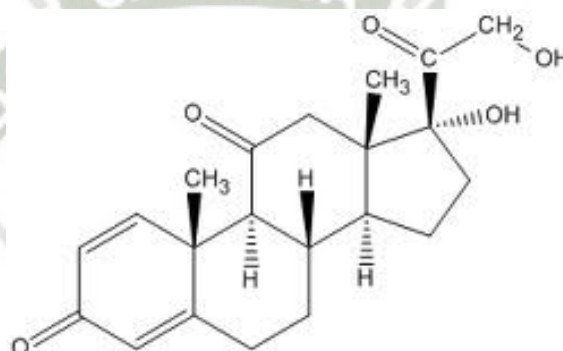


Figura 11: Estructura molecular de un corticoides tomado de Dale.

I. Farmacología y mecanismo de acción

La prednisona y la prednisolona son los corticoides usados con más frecuencia en el tratamiento de la EII.

Otra presentación oral de esteroides es la budesonida de liberación ileal, sin efecto de primer paso por el hígado, con una afinidad por el receptor glucocorticoide 50 veces superior a la prednisona, lo cual la hace más potente y menos tóxica.

La biodisponibilidad sistémica de los corticoides, tras su administración oral es del 50-80%; aunque la absorción oral de la prednisona puede estar retrasada en los pacientes con EII. Son reducidos en el hígado por la 11 B hidroxigenasa a prednisolona que es la forma biológicamente activa. En el plasma circulan unidos a la albumina. Luego de su hidroxilación y conjugación hepática son eliminados por la orina.

Luego de su administración oral difunden de forma pasiva a través de las membranas celulares interactuando con receptores intracelulares específicos presentes en la mayoría de las células del cuerpo. Esta unión produce una alteración estructural liberando el receptor de sus proteínas asociadas; el complejo esteroide-receptor se une a los factores del DNA que responden a esteroides permitiendo la regulación de la transcripción genómica de las citocinas y otros mediadores inflamatorios.

Se han observado otros efectos que definen el carácter multifactorial de su acción con bloqueo de la vía del ácido araquidónico mediante la inhibición de la fosfolipasa A2, inhibición de la función leucocitaria e inhibición de la liberación de citocinas proinflamatorias.

Ii. Indicaciones

Estos fármacos se pueden administrar por vía parenteral, oral o rectal en función de la severidad de las EII. Por vías oral y parenteral se utilizan principalmente en el tratamiento de los brotes agudos. La vía parenteral se utiliza en pacientes con enfermedad severa. Suelen emplearse dosis de 40-60 mg/día durante 6-7 días, pero tan rápidamente como sea posible deben pararse a la vía oral.

Por vía oral, el corticoide más utilizado es la prednisona a dosis de 1 mg/kg/día especialmente en pacientes con EII severa o moderada.

Cuando el paciente está en la fase de remisión, la pauta de corticoides va reduciéndose progresivamente para evitar la aparición de efectos adversos.

Los corticoides también pueden administrarse tópicamente vía rectal como tratamiento de primera línea en pacientes con brote leve o moderado. El tratamiento más empleado por vía tópica es la budesonida.

Las pautas de tratamiento con el uso de corticoides son:

- Colitis Ulcerosa
 - Fase Leve-Moderada: Corticoides por vía rectal
 - Fase Severa: Corticoides oral y por vía rectal.
 - Fase Fulminante: Corticoides por vía intravenosa.

- Enfermedad de Crohn
Fase Moderada: Corticoides orales (Prednisona 1 mg/kg/día)
Fase Severa: Corticoides por vía intravenosa.

Iii. Efectos secundarios

Los efectos secundarios de los corticoides son conocidos y agresivos.

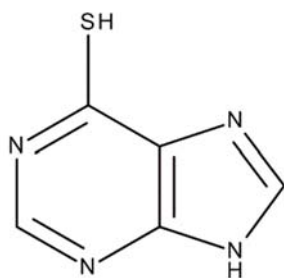
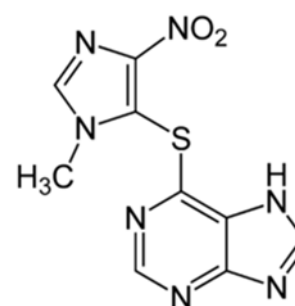
Estos pueden englobarse en dos grandes grupos: los que resultan de una retirada brusca de los mismos y los derivados de su administración prolongada.

La complicación aguda, mas grave, derivada de la retirada brusca, es la insuficiencia suprarrenal aguda. Otros efectos secundarios agudos son la hipertensión arterial, la hipercolesterolemia, la retención hídrica, el aumento de peso, la “cara de luna llena”, la intolerancia a la glucosa, la leucocitosis el insomnio, labilidad emocional y los cuadros psicóticos.

Algunos efectos secundarios como la miopatía, aparición de cataratas y glaucoma, la osteoporosis y el retraso de crecimiento se deben a la supresión del eje adreno-hipofisario derivado de la administración prolongada de los esteroides. ^{8, 13, 27, 40.}

1.8.3. INMUNOMODULADORES: AZATIOPRINA (AZA) Y MERCAPTOPURINA (MP)

Actualmente la AZA y su metabolito activo 6-mercaptopurina, son los fármacos inmunomoduladores mas frecuentemente utilizados en los pacientes con EII.

Figura 12: Estructura molecular
de MercaptopurinaFigura 13: Estructura molecular de
Azatioprina

I. Farmacología y mecanismo de acción

El profármaco azatioprina es análogo de la purina, que después de absorberse, se metaboliza a 6-mercaptopurina, siendo el metabolito activo.

Tanto la AZA como la MP son absorbidas en el intestino delgado tras su administración oral. Sin embargo su biodisponibilidad es mala (16% y 50% respectivamente) y la vida media plasmática corta (1-2 horas).

Se metaboliza en el hígado a MP y se excreta por riñón.

Se atribuye su efecto al hecho que sean análogos de la purina y que inhiban la biosíntesis de nucleótidos y por lo tanto inhiben la producción de proteínas, ARN y ADN. Traduciéndose en una disminución de las reservas de nucleótidos en los linfocitos T y B y la respuesta inmune primaria, así como en la función de los linfocitos y células natural killer.

La eficacia terapéutica se consigue después de seis a doce semanas de iniciado el tratamiento. Su acción terapéutica provoca un efecto ahorrador de esteroides, reduciendo la toxicidad asociada a altas dosis y uso prolongado de los mismos.

Ii. Indicaciones

Actualmente, la AZA y su metabolito son los fármacos inmunomoduladores mas usados en los pacientes con EII.

Las principales indicaciones son la inducción de la remisión y prevención de la recidiva en los pacientes con EII, tanto CU como EC, corticodependientes o

corticorefractaria. Otras indicaciones aceptadas son la prevención de la recurrencia postquirúrgica en los pacientes con EC, pacientes con EC que presentan fistulas y en la prevención del retraso de crecimiento en los niños con enfermedad activa.

La dosis recomendada de la AZA es de 2,5 mg/kg/día y la de MP 1,5 mg/kg/día. La duración del tratamiento no está establecida pero se recomienda mantener al menos 4-5 años.

La lenta aparición de los efectos beneficiosos de la AZA y la MP en los pacientes con EII, han hecho imprescindible la utilización de otros inmunosupresores como la ciclosporina o el metotrexate.

Las pautas de tratamiento con inmunosupresores son:

- Colitis Ulcerosa
Fase Severa: Inmunosupresores por vía intravenosa.
Fase de Remisión: AZA o MP.
- Enfermedad de Crohn
Fase Moderada: AZA o MP
Fase Severa: Inmunosupresores por vía intravenosa
Fase de Remisión: AZA o MP.

iii. Efectos secundarios

Los pacientes tratados con AZA y MP han presentado efectos secundarios como náuseas, vómitos, pancreatitis, leucopenia, toxicidad hepática, artralgias, fiebre y leucopenia. Siendo el efecto secundario dosis-dependiente más importante la mielosupresión. [13, 27, 28, 40.](#)

1.9. COMPLICACIONES: CANCER DE COLON

Una de las complicaciones más reconocidas de las EII es el desarrollo del cáncer colorrectal (CCR) que resulta de las lesiones de displasia epitelial.

Diversos estudios nos muestran la asociación de las EII con un riesgo aumentado

para desarrollar este cáncer.

Cosnes et al. reportaron que la incidencia prevalece en aumento en el Oeste desde hace 50 años, con un índice mayor de relación en el caso de la Colitis Ulcerosa (11.2%) sobre la Enfermedad de Crohn (4.8%)

Es importante tomar en cuenta los diversos factores que crean un ambiente favorable para que el cáncer se inicie, se desarrolle y progrese. Entre estos los más importantes son: La edad del paciente al inicio de la enfermedad, la duración y extensión de la enfermedad, la predisposición genética, la gravedad de la inflamación, la asociación de las EII con esclerosis. Sin embargo ya existen protocolos de prevención y de vigilancia del desarrollo del CCR en las EII. (Farre, 2007). Entre estos, estudios que recomiendan terapias farmacológicas como el suplemento de Folatos, el uso de Acido Ursodeoxicólico, de Estatinas y de la misma mesalazina,^{27, 41, 42.}

2. TARGETING DRUGS DIRIGIDAS AL COLON

2.1. Principios de las “targeting drugs” dirigidas al colon

Las targeting drugs dirigidas al colon se refieren a la administración de fármacos dirigida al tracto gastrointestinal inferior, que se produce principalmente en el

intestino grueso.

La liberación de drogas al colon asegura el tratamiento directo en el sitio de la enfermedad, una dosis más baja y menos efectos secundarios sistémicos.

Esta técnica es útil para abordar las necesidades específicas en el tratamiento de enfermedades situadas en el colon.

Por consecuencia, las targeting drugs dirigidas al colon son beneficiosas para el tratamiento de las Enfermedades Inflamatorias Intestinales.

Debido a que la administración por vía oral, mejora la absorción, la biodisponibilidad y la farmacodinamia de los medicamentos en la zona específica, se reduciría los posibles efectos adversos de estos medicamentos tales como las hemorragias en el caso de los salicilatos. Esto conlleva a la mejoría del paciente, teniendo en cuenta la comodidad y la efectividad del tratamiento. ^{17, 18, 37, 39.}

2.2. Mecanismos de las targeting drugs dirigidas al colon

2.2.1. Sistema pH-dependiente.

En el tracto gastrointestinal (TGI) existe un gradiente de pH la cual va aproximadamente de 1.2 en el estómago, 6.6 en el intestino delgado proximal a 7.5 en el intestino grueso, teniendo en cuenta el pH del colon que es de 6.4.

A partir de este principio, el objetivo de esta técnica es proteger al medicamento de los cambios de pH durante el paso por el TGI. Por esta razón y para permitir el colon targeting, la droga debe contar con un recubrimiento.

Las características más importantes que se deben tomar en cuenta son la solubilidad y el pH del recubrimiento durante el trayecto de la droga en el TGI.

En el caso del estómago, el recubrimiento debe ser insoluble y resistente al pH ácido para luego, al pasar por el intestino se convierta en su forma ionizada; y al mismo tiempo el pH aumente; para así disolverse en el colon.

El grosor de este recubrimiento implica también un factor importante para la liberación del medicamento. En estudios realizados, se muestran los beneficiosos resultados que obtuvieron a partir de la Mesalazina recubierta por Eudragit L 100 (Comercializada como Claversal, Salofalk, Rowasa). Esta formulación está

recubierta con una capa de un polímero aniónico de 60 a 150 μ m de espesor, la cual es insoluble debajo de un pH 7, así la liberación se puede dar en el íleon terminal o en el colon.

Sin embargo, ya sea una formulación exitosa, han existido casos de fallo en la disolución del recubrimiento, reportados por pacientes que han observado las tabletas intactas en sus heces. ^{9, 22, 37, 39.}

2.2.2. Sistema dependiente del Tiempo de Tránsito.

En este sistema, el sitio de liberación depende del tiempo de tránsito de la droga en el TGI, lo cual hace favorable para desarrollar una formulación con el objetivo de llegar a tener una liberación precisa en el colon.

Con este fin, se incorpora un tiempo de retardo de liberación hasta que el sistema transite desde la boca hasta el colon. Se considera usualmente un tiempo de latencia de 5 horas, de las cuales 3 a 4 horas se da en el intestino delgado. Este tiempo es resistente a cualquier cambio de dieta o de estado fisiológico, como el pH o la presión sistémica, pero es duramente afectado por la naturaleza de la formulación administrada. La liberación es inducida por ósmosis o cambios del pH dentro de la forma de dosificación. Sin embargo la complejidad del diseño, a menudo incorporando varias capas, puede limitar la captación comercial debido a los procesos de fabricación y al coste.

Shah et al. describieron un sistema con una presentación en tableta, la cual pudo liberarse en el colon. La formulación consto de tres partes (i) una parte central conteniendo la droga y los excipientes (ii) una membrana interna polimérica semipermeable, conteniendo un plastificador, el cual permite el flujo de agua pero previene la difusión hacia afuera de la droga y (iii) una membrana externa la cual se disuelve con un pH de 5.5. o debajo de este.

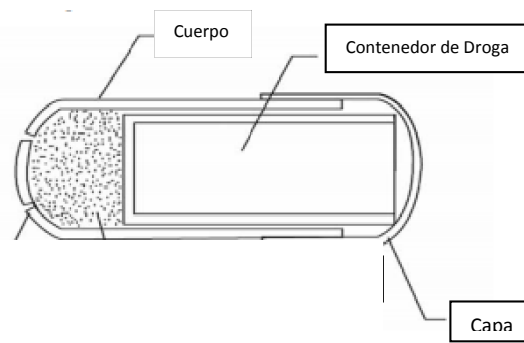


Figura 14: Sistema dependiente del tiempo de tránsito

La capa externa mantiene a la tableta intacta hasta llegar al intestino delgado. Una vez la tableta llegada al intestino delgado, la capa entérica se disuelve gracias a los fluidos del TGI para difundirse a través de la membrana semipermeable en la parte central. Como resultado, la parte central se libera durante el tránsito de la tableta a través del intestino delgado. Finalmente, después de un periodo de 4 a 6 horas de tránsito en el intestino delgado, la parte del medio hace explotar la membrana semipermeable dejando liberar a la droga en el colon ^{9,10, 18, 39}.

2.2.3. Sistema dependiente de la flora bacteriana del colon.

La flora microbiana ya descrita en el ítem 1.7 tiene un papel fundamental en este método. Las bacterias del colon generan su propia energía por fermentación de polisacáridos que no son digestivos en el resto del TGI, para poder hacerlo, las bacterias producen muchas enzimas hidrolíticas y reductoras como las azoreductasas y las b-glucuronidasas.

Gracias a la presencia de estas enzimas biodegradables presentes en el colon, el uso de polímeros biodegradables para el colon targeting parece ser el sistema más específico comparado a otros.

Estos polímeros protegen a la droga en el estómago y en el intestino delgado y son capaces de liberar la droga en el colon.

Llegada al colon, el revestimiento de la droga sufre una degradación enzimática por las bacterias presentes, con el fin de liberar el principio activo.

Estudios anteriores (Karrout, 2009) han identificado los principales y mas ventajosos polimeros usados para el revestimiento del principio activo; Esto incluye polimeros como la Etilcelulosa, Dextrina(Nutriosa), Almidon, etc.

Karrout et al. proponen recubrimientos polimericos basados en una mezcla de Dextrina (Nutriosa): Etilcelulosa lo que permite el colon targeting de drogas como el 5ASA. Es importante destacar que estos recubrimientos estan adaptados a las condiciones del sitio de accion, en este caso el colon, teniendo como condicion fundamental la microflora y el pH en el estado de la enfermedad.

Es importante tener en cuenta ciertos puntos en este método, como la protección de los polisacáridos para evitar la liberación temprana de la droga, la influencia ambiental en las enzimas comensales como la dieta y el uso de antibioticos y por ultimo, la diferencia de la flora bacteriana entre pacientes sanos y pacientes con la enfermedad.^{4, 20, 38.}

2.2.4. Sistema de Presión Controlada

Este sistema utiliza las contracciones peristálticas del colon para causar la ruptura de la cubierta externa para permitir la liberación de una solución de fármaco.

El proceso digestivo en el TGI involucra la actividad contráctil del estomago y de los movimientos peristálticos para la propulsión del contenido intestinal. En el intestino delgado, el contenido se mueve de un lado al otro, del mismo modo que el colon ascendiente al colon transversal por movimientos peristálticos comúnmente llamados como la masa peristáltica.

Estas ondas peristálticas son de corta duración, ocurriendo solo de 3 a 4 veces al día. Sin embargo, estas aumentan la presión luminal del colon, lo cual forma la base para este sistema.

La presión luminal como resultado del movimiento peristáltico se ve aumentada en el colon comparada a la presión en el intestino delgado, a causa de la diferencia en la viscosidad del contenido luminal. En el estómago y en el intestino delgado, el contenido es más fluido por la abundante cantidad de agua en los jugos digestivos pero en el colon, la viscosidad del contenido es alta debido a la reabsorción del agua desde el lumen y la formación de heces. Este sistema en

forma de cápsula es resistente a las presiones del TGI alto pero colapsa en el intestino grueso debido al aumento de presión. Estos sistemas de suministro utilizan materiales utilizados en supositorios como es el caso del etilenglicol, de manera que se funden y actúan como un globo que se mantiene intacto hasta que el aumento de la presión en el intestino grueso causa la ruptura y liberación del fármaco. Sin embargo, como todo método, se debe tomar en cuenta las condiciones como la diarrea, síntoma clásico en la enfermedad y la administración de fármacos.²⁹

2.3. ANTECEDENTES DE INVESTIGACION

2.3.1. Estudios in vitro

Recientemente, resultados prometedores con 5ASA han sido presentados usando modelos in vitro con muestras fecales frescas de pacientes con EII. (Karrout)

Los resultados muestran diferente tipos de bacterias capaces de degradar los polisacáridos in vitro. Sin embargo, estos estudios requieren más de una sola evaluación y una justificación de un diseño racional, considerando la inexactitud de los métodos de disolución, que incorpore la simulación fisiológica del colon. Para sobrellevar las limitaciones de la disolución, Yang et al, proponen el uso de heces de animales como rata, conejo y cerdo como medio de disolución.^{23, 27}

2.3.2. Estudios in vivo

Los estudios in vivo están usualmente encaminados a evaluar el sitio específico de liberación de la droga para obtener relevante información farmacocinética del sistema de liberación. Aunque los modelos animales han obtenido ventajas, los estudios con seres humanos han empezado a aumentar para este tipo de evaluación con la ayuda de técnicas de visualización como el y-scientigraphy imaging, para establecer la ubicación de la liberación del fármaco.

Actualmente, varios estudios están tratando de evaluar la eficacia del sistema microflora dependiente in vivo, mediante el uso de roedores infectadas con EII, con la inducción de agentes exógenos como los TNBS con el fin de cuantificar el

5ASA y evaluar la colitis.

TABLA 9
MODELOS DE COLITIS EXPERIMENTAL INDUCIDOS
POR AGENTES EXOGENOS

MODELOS DE COLITIS EXPERIMENTAL INDUCIDOS POR AGENTES EXÓGENOS								
Ác. acético	Inmuno-complejos	TNBS/Etanol	Oxazolona	PG-PS	Carragenina	DSS	Ciclosporina	Indometacina
Enema	Enema/i.v.	Enema	Enema	Intra-mural	Oral	Oral (ciclos)	s.c.	s.c./oral
Rata, ratón, conejo, cobaya	Conejo, rata	Rata, ratón conejo	Rata, ratón	Rata	Cobaya, rata ratón	Rata, ratón, hámster	Ratón	Rata, ratón, perro
Colon distal y recto (distribución continua)				Colon proximal y ciego (discontinua) (continua)	Colon (continua)		Intestino delgado (discontinua)	
Fase aguda hasta 3 días post-inducción					3-6 semanas	7-10 días		

Fuente: Mañé.

Este último sistema descrito es una herramienta prometedora para la terapia de las EII. Nuevos ensayos sobre este métodos se vienen desarrollando usando la PPRE-Luc en ratones, la cual emite fotones hacia los ratones transgénicos que ayudan a mostrarnos la cantidad de 5ASA de un modo de imagenología.^{11, 23, 27.}

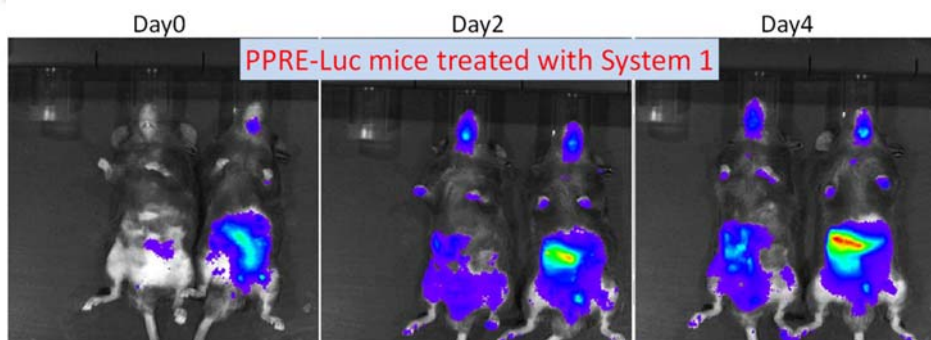


Figura 15: Métodos In Vivo del colon targeting tomado de Karrout,

CAPITULO 2:

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MUESTRAS

- Muestra farmacológica: Pellets Mesalazina (5ASA) recubiertos al 15% con

Dextrina (Nutriosa): Etilcelulosa.

- Muestra Biológica: 02 muestras fecales de pacientes con EII del Hospital Regional de Lille, Francia.

2. EQUIPOS Y MATERIALES

2.1. EQUIPOS

- Balanza Analítica METTLER TOLEDO
- Disolutor BIO DIS – TM VARIAN PARIS
- Cámara de anaerobiosis (Modular Atmospheric Controlled System anaerobic chamber) DW SCIENTIFIC, SHIPLEY, ENGLAND.
- Autoclave SYSTEC
- Estufa HERAEUS
- Sonicador SONICS
- Bomba al vacío KAESER
- Campana HERAEUS
- Cocina
- Centrifugadora SCIENTIFIC
- HPLC PROSTAR 230, VARIAN, PARIS
- Microscopio
- Horno MEMMERT
- Pipetas Automáticas EPPENDORF

2.2. MATERIALES

- Placas Petri 100 x 150 mm.
- Frascos de vidrio
- Probetas 100ml; 50 ml; 25 ml.
- Viales HPLC 2 ml.

- Tubos EPPENDORF para centrifugar.
- Asas Khole
- Vasos de precipitado
- Pipetas Pasteur
- Fiolas 1000 ml, 500 ml, 50 ml, 25 ml, 5 ml.
- Tubos de ensayo 13 x 100 mm; 16 x 150 mm.
- Pipetas Vidrio 10 ml; 5 ml; 2 ml; 1 ml.
- Jarras de conservación anaeróbica GASPAK

2.3. MEDIOS DE CULTIVO

- Agar sangre
- Medio Viande Levure (VL)
- WILKINS-WEST liquido
- WILKINS-WEST profundo
- Mc Conkey
- Solución de Ringer
- Kliger
- Citrato Simmons
- Galería anaeróbica:
 - ✓ Leche
 - ✓ Almidón
 - ✓ Base
 - ✓ Gelatina
 - ✓ Nitrato
 - ✓ Esculina
 - ✓ Sacarosa
 - ✓ Glucosa
 - ✓ Glicerol
 - ✓ Lactosa
- D-coco

- Catalasa
- Caldo Peptonado
- Indol (Reactivo de Kovacs)
- Coloración GRAM
- Infusión Cerebro Corazón (BHI)
- API NE20
- API E 20

2.4. REACTIVOS

- Metanol (°HPLC)
- Acido Acético (1% w/v)
- Acetonitrilo (°HPLC)
- Acido Clorhidrico (0.1 M)
- Buffer Fosfato (0.1 M)

3. METODOLOGIA

A lo largo del estudio, se pudo obtener solo dos muestras fecales, las que corresponden a dos pacientes diferentes. La primera muestra (F1) corresponde a un paciente con EC, y la segunda muestra (F2) corresponde a un paciente con UC. Ambos pacientes dieron su consentimiento respectivo para ser involucrados en este estudio.

Los pellets del principio activo usado en este estudio, la mesalazina o Acido 5 Aminosalicílico, fueron preparados en el departamento del “Industrial Pharmaceutics” usando materiales y métodos descritos en previos estudios (Karrout et al.): Pellets recubiertos por una combinación de polímeros al 15%, Nutriosa::Etilcelulosa, los que demostraron su eficacia en estudios in vitro. ^{19, 21, 37.}

3.1. SIMULACION DEL TGI (ESTOMAGO E INTESTINO DELGADO)

El BIO-DIS™ (Varian, Paris, France) se utilizó para crear un ambiente simulado del tracto gastrointestinal.

Para cada cepa se utilizó el mismo método: Se empezó tomando tres muestras de 25 mg aprox. de pellets de 5-ASA recubiertos con los polímeros.

Figura 16: Disolutor
laboratorio de
Universidad de Lille 2.



BIODIS tomada en el
Farmacotecnia de la

Las tres muestras se dispusieron, en
primera instancia, en un medio ácido,
simulando las condiciones
estomacales. Se introdujeron las 3 muestras en tubos de doble entrada para luego,
ser introducidos en un sistema de agitación (BIODIS) que consta de 3 vasos con
200 ml de Acido Clorhídrico 0.1 N, cada uno con una velocidad de agitación de
10 rpm, durante dos horas.

Pasadas las dos horas, estas mismas muestras se dispusieron en un medio básico,
simulando las condiciones del intestino delgado usando en este caso 3 vasos con
200 ml de Buffer Fosfato pH 7.4. Utilizando una velocidad de agitación de 5
revoluciones por minuto, durante 10 horas.

Para ambas simulaciones, tanto estomago como intestino, se necesito una
temperatura de 37° C, temperatura corporal normal. Esta temperatura fue
mantenida constante por un baño de agua mediante una bomba.

3.2. SIMULACION DEL INTESTINO GRUESO (COLON)

Fue importante generar ambiente de anaerobiosis. Luego de haber sometido a los pellets a los diferentes ambientes, las tres muestras fueron delicadamente retiradas del tampón fosfato y llevadas a tres frascos, conteniendo una mezcla de medio de cultivo y bacterias diluidas. El medio de cultivo elegido no debe contener fuentes de alimentación para las bacterias, ya que estas solo deben tener como fuente los polisacáridos del recubrimiento de los pellets. El medio de cultivo utilizado fue el de Viande/Levure (VL) (Anexo 5) que no contiene azúcar que las bacterias podrían utilizar en lugar de la dextrina (Nutriosa) o la etilcelulosa de los pellets.



Figura 17: Cámara de Anaerobiosis tomada en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Lille 2.

En el caso de las cepas aisladas se utilizaron tres frascos con 99 ml de Medio VL más 1 ml de cepa bacteriana. Esto cambia para el caso de las muestras fecales, en la que utilizamos tres frascos con 97.5 ml de Medio VL más 2.5 ml de cepa bacteriana; como también para las mezclas: en la primera mezcla C1 se utilizaron tres frascos con 96 ml de Medio VL más 1 ml de E. Coli y 3 ml de Bacteroides. En la segunda mezcla C2 se utilizaron tres frascos con 93 ml de Medio VL mas 1 ml de E. Coli, 3 ml de de Bacteroides y 3 ml de Ruminococcus. En total, cada frasco debía contener 100 ml de volumen final.

Es importante recalcar que los frascos fueron envueltos en papel aluminio para evitar que la molécula, siendo fotosensible, se degrade por la luz. Los frascos ya preparados se llevaron a una campana especial de anaerobiosis (DW Científico, Shipley, Inglaterra). La cual crea un ambiente de anaerobiosis (5% de CO₂, 10%

de H₂, 85% de N₂) a una temperatura constante de 37°C. Los frascos se colocan en una plataforma de agitación a 40 rotaciones por minuto para mantener los requisitos del ambiente colónico.

El acceso a la cámara para tomar las diferentes muestras, fue por la vía de sus guantes externos, los que forman un sello hermético alrededor de los brazos del usuario para prevenir fugas de aire oxigenado en la cámara.

- **TOMA DE MUESTRA**

Se tomaron muestras regulares del contenido de los frascos, utilizando agujas y jeringas de 5 ml. Cada muestra tenía una aguja y jeringa específica, para minimizar la contaminación de las muestras.

Las muestras tomadas fueron siempre de 2 ml y este volumen iba siendo reemplazado con 2 ml de medio cultivo, para mantener un volumen total de 100 ml en cada frasco.

Las muestras se colocaron en tubos de 2 ml rotulados e inmediatamente cubiertos con papel aluminio, para ser congelados con el fin de impedir cualquier degradación del fármaco hasta su próximo paso por HPLC.

La toma de muestra empieza luego de las doce horas transcurridas durante la simulación del TGI y finaliza generalmente a las 60 horas de evaluación. Claro está que la frecuencia de muestreo varía con cada muestra fecal, bacteriana o combinación debido a la variabilidad de las tasas de crecimiento de bacterias. Los tiempos de muestreo de cada una de las muestras varían según las bacterias que contienen.

Una vez que la muestra final fuese tomada, todos los pellets debían ser triturados con la ayuda de una pequeña espátula para liberar lo que resta del fármaco, si fuese el caso. Luego, los frascos debían ser agitados durante otros treinta minutos. Luego de esto, se toma la última muestra de los frascos con los pellets triturados con el objetivo de analizar la cantidad total de 5-ASA en los frascos y así poder calcular la cantidad de fármaco liberado por las bacterias.

3.3. ANALISIS BACTERIANO

Fue necesario un análisis bacteriano para poder identificar a las bacterias predominantes del colon presentes en las muestras fecales obtenidas y utilizadas en esta investigación. Una vez identificadas las bacterias de las muestras fecales, las cepas adecuadas para este ensayo, se aislaban para poder trabajar con ellas individualmente o en mezcla.

Todas las cepas fueron sembradas antes y después del muestreo con el fin de calcular el crecimiento de bacterias y la pureza de las muestras.

Las muestras fueron sembradas en medios de cultivo selectivos y no selectivos y se incubaban a 37°C, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas.

Todas las manipulaciones requeridas se trabajaron bajo una campana de flujo laminar utilizando técnicas asépticas



Figura 18:
Metodología
diluciones,
el
de

de las
tomada en
Laboratorio

Microbiología de la Universidad Lille 2.

Con el objetivo de analizar el contenido y el crecimiento de las bacterias se

tomaron muestras de 1 ml de las muestras fecales/aisladas diluidas en 9 ml de solución de Ringer (Anexo 6) con el objetivo de tener una dilución de 10^{-1} .

Luego, se continúa con la dilución tomando 1 ml de esta dilución y añadiéndola al siguiente tubo de ensayo con otros 9 ml de solución Ringer, esta vez la dilución sería de 1×10^{-2} y con este método continuar en serie hasta la dilución de 1×10^{-9} . Seguido a esto, se procede a inocular 0.1 ml de muestra de cada uno de los tubos de ensayos a placas de los diferentes medios, sin olvidar la importancia de la rotulación en estos casos. Finalmente, las placas se dejaron a incubación durante el tiempo y las condiciones necesarias, según el medio.

En el caso de las muestras fecales, diferentes colonias fueron aisladas con el objetivo de someterse a diferentes pruebas para la identificación de cepas bacterianas.

Del mismo modo, al finalizar la manipulación del muestreo, se toma 1 ml de uno de los tres frascos, normalmente el frasco con más turbiedad, para hacer diluciones en serie con el fin de inocular las bacterias existentes, con el mismo método usado para las bacterias antes del muestreo.

Una vez las placas incubadas, el recuento final de bacterias es comparado con el recuento inicial de bacterias para calcular el grado de crecimiento de las bacterias y evaluar la pureza.

3.4. IDENTIFICACION BACTERIANA

Las bacterias presentes en las muestras fecales se identificaron usando criterios de identificación como se describen en el Anexo 1 y se evaluaron para determinar que cepas tendrían probablemente la mayor influencia en la liberación del fármaco a partir de la degradación del recubrimiento de polisacáridos de los pellets. Bajo este criterio se selecciono cepas aisladas para experimentar.

Inicialmente las muestras fecales fueron sembradas en Agar Columbia Sang (Anexo 2).



Figura 19: Placa de Agar Sangre para la dilución 10^{-5} . Tomado en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Lille 2.

Luego de siete días, las colonias halladas fueron sembradas en W.W. profundo con el fin de observar su comportamiento aeróbico, anaeróbico o facultativo. (Anexo 3). Viendo el crecimiento aeróbico que se limita a la parte superior del medio de cultivo; el crecimiento anaeróbico que se ubica en la parte inferior; y por último el crecimiento facultativo localizado a lo largo del tubo. Con esta información, las colonias fueron aisladas y guardadas en W.W. líquido (Anexo 4).

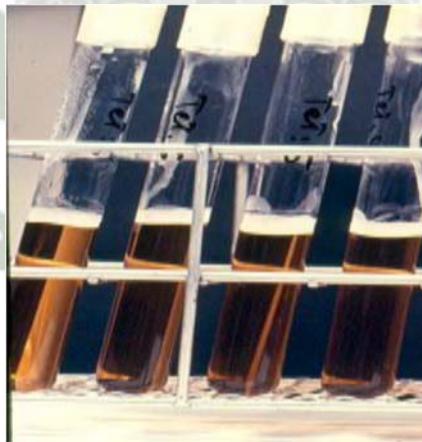


Figura 20: Siembre de bacterias en W.W. líquido. Tomada en el laboratorio de Microbiología de la Universidad de Lille 2.

Posteriormente, las bacterias fueron coloreadas por tinción GRAM (Anexo 7).

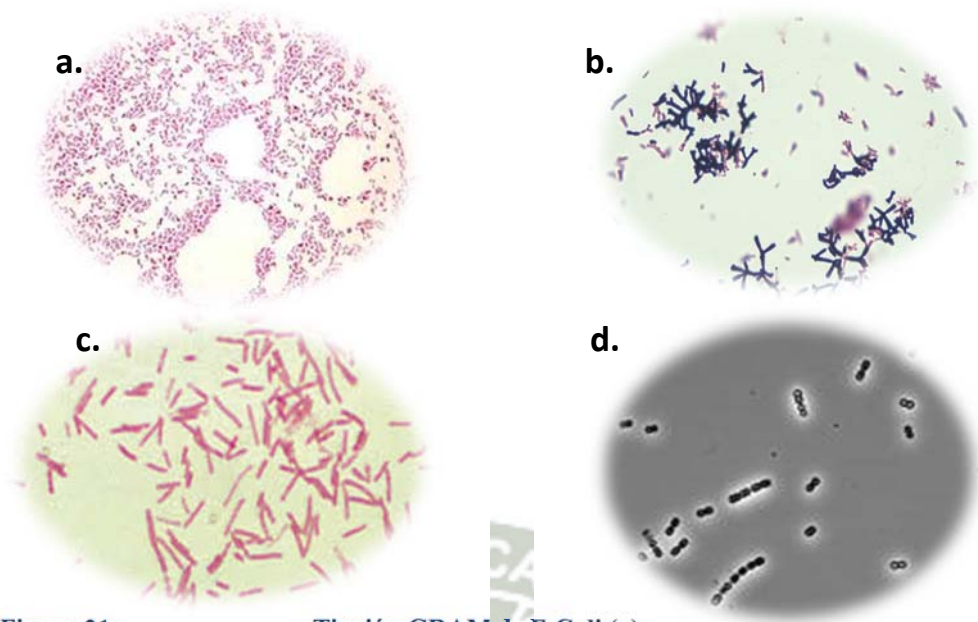


Figura 21: Tinción GRAM de *E.Coli* (a); *Bifidobacterium* (b); *Bacteroides Ovatus* (c) y *Ruminococcus* (d). Tomadas en el laboratorio de Microbiología de la Universidad de Lille 2.

Luego de la tinción GRAM, al saber la morfología de las bacterias se decide que pruebas utilizar. En el caso de los anaerobios estrictos, según sus características en la coloración GRAM se procedió a sembrar en la galería anaerobia: consiste en un conjunto de pruebas que ayudan a la identificación de los microorganismos anaerobios (Anexo 8).

En el caso de las bacterias aerobias estrictas o facultativas, dependiendo de la tinción GRAM se procedió a realizar diferentes pruebas: Si la bacteria encontrada era Bacilo GRAM positivo, se continuaba a hacerle la prueba de la catalasa (Anexo 9). Si esta era positiva, estábamos al frente de una cepa de *Corynebacterium*; Si ésta era un Bacilo GRAM negativo, se procedía a analizar si estábamos frente a la familia de enterobacterias (Anexo 11), usando medios y pruebas de identificación como Kligler(Anexo 10), Indol (13), Citrato (Anexo 14) y API 20 E(Anexo 15).



Figura 22: Análisis de bacterias. Usando W.W. Profundo – Citrato de Simmons e Indol. Tomada en el laboratorio de Microbiología de la Universidad de Lille 2.

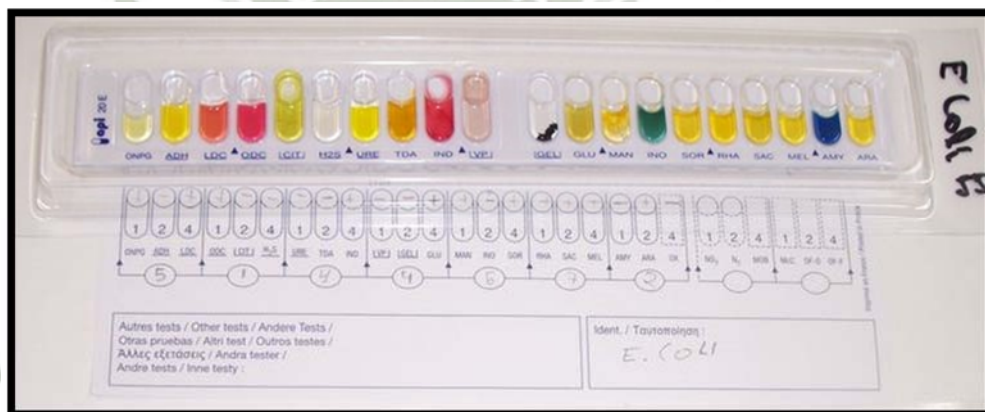


Figura 23: Análisis de E.Coli usando API 20 E. Tomada en el laboratorio de Microbiología de la Universidad de Lille 2

En caso que la bacteria hubiese sido un Cocco GRAM positivo, se le hacía la prueba de la catalasa. Si la bacteria era catalasa positiva podríamos estar frente a dos bacterias: *Stafilococcus* o *Microcococcus* (Diferenciándose por su anaerobiosis). En el caso que la catalasa fuera negativa, se procedía a sembrar en el medio de cultivo DCoco (Anexo 16). En el medio DCoco se puede observar el hidrolisis de la esculina, entonces, si la bacteria analizada marcaba positiva para esta prueba, la bacteria sería una cepa de *Enterococcus* y por lo contrario, si ésta fuera negativa, la bacteria sería una cepa de *Streptococcus*.

Por último, si la tinción GRAM mostraba Cocos GRAM negativo, la bacteria era identificada como *Neisseria*.

3.5. CUANTIFICACION DEL PRINCIPIO ACTIVO POR HPLC

Las muestras, previas al análisis, debieron ser congeladas durante la noche en un refrigerador a una temperatura de 2° C.

Una vez descongeladas, se llevó a las muestras a un proceso de centrifugación durante cinco minutos a 15.000 RPM, utilizando filtros de tamaño 0.22 μ m y jeringas de 5 ml para pasar la muestra a viales de vidrio opaco para pasar al HPLC (HPLC; Prostar 230, Varian, Paris, Francia). Las características del sistema se muestran en la Tabla 10.

TABLA 10
CARACTERISTICAS DEL USO DEL HPLC

HPLC (Prostar 230, Varian, Paris, France)	
Columna	Phenomenex Pursuit 5 μ m C18 100 A
Software	Varian Galaxie Chromatography System
Detector	UV Deuterium lamp detector was set at a wavelength of 300nm
Velocidad de Flujo	1.5 ml/min
Tiempo de Retención	3 minutos
Volumen de Inyección	20 μ l
Presión	<130 Bars.
Fase móvil	Etanol. Acido Acético

Fuente: Karrout.

El método desarrollado se utiliza para crear una nueva secuencia. La secuencia se estableció para garantizar el periodo de calibración antes de las muestras y además, la secuencia detalla toda la información acerca de los viales que están siendo cargados en el inyector automático con el objetivo de interpretar los resultados obtenidos.

Se utilizó una fase móvil compuesta por: 10% de Etanol y 90% de solución acuosa de ácido acético (1% w/v) (Siew, Basit & Newton)

Con el objetivo de calcular con precisión la cantidad de fármaco liberado para cada muestra se completo una curva estándar. La curva estándar utilizó 5ASA y la fase móvil de la siguiente manera. Se preparó una solución madre conteniendo 20 mg de 5-ASA en fase móvil csp. 100 ml. A partir de esta solución madre se prepararon diez diluciones seriadas conteniendo 20µg, 40µg, 60µg, 80µg, 100µg, 120µg, 140µg, 160µg, 180µg y 200µg por 100ml.

Cada dilución se preparó utilizando la solución madre y fase móvil. Se utilizaron pipetas Eppendorf y placas vortex para la mezcla.

Los viales conteniendo el blanco y los estándares a diferentes concentraciones fueron colocados en el inyector automático para ser analizados por hplc.

Las diluciones seriadas fueron analizadas por el HPLC con el fin de hallar una curva estándar y determinar el tiempo de retención del 5-ASA en la columna. Esto permite la identificación de los picos de 5-ASA en las muestras y así, la cantidad de droga presente.

A partir de la curva estándar se sabía que el tiempo de retención de 5-ASA en la columna utilizada fue de 2,2 minutos.

Como para cada muestra, ya sea fecal, aislada o combinada, se usó tres frascos con los pellets incorporados, fue necesaria calcular la desviación estándar para identificar claramente la variabilidad presente en los resultados. ¹⁵

CAPITULO III:

RESULTADOS Y DISCUSION

1. RESULTADOS

Las cepas de bacterias halladas a partir de las muestras fecales de los dos pacientes con EII fueron: *Citrobacter diversus*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia Coli*, *Staphilococcus*, *Enterococcus*, *Clostridium Ramosum*, *Veillonella*, *Bifidobacterium*, *Rumminococcus* y *Bacteroides Ovatus*.

A partir de estas bacterias halladas, se hizo la separación de aquellas cepas que puedan ser capaces de fermentar los polisacáridos de los pellets del 5-ASA.

Tomando parámetros como la fermentación de polisacáridos, el crecimiento microbiano y resultados de pruebas bioquímicas, las bacterias seleccionadas fueron: *Escherichia Coli*, *Bacteroides Ovatus*, *Bifidobacterium* y *Rumminococcus*.

A cada una de las muestras del ensayo se les asignará una letra y un número, con el propósito de facilitar la comprensión de los resultados. Siendo F1-2 las muestras fecales; B1-4 las muestras puras aisladas (B1: *Echerichia Coli*, B2: *Bifidobacterium*, B3: *Bacteroides*, B4: *Ruminococcus*); y por ultimo C1-2 las combinaciones de bacterias (C1: Combinación de B1 y B3, C2: Combinación de B1, B3 y B4).

Los resultados del crecimiento de bacterias de las muestras fecales (Tablas 11 - 14) en el caso del recuento de bacterias en medio no selectivo, es decir en Agar Sangre, mostraron que la muestra F2 con un total de 3×10^3 UFC/ ml fue menor al total de la muestra F1 con 3.37×10^4 UFC/ml. Del mismo modo, en el caso de las placas con medio selectivo, es decir en Agar Mc Conkey la muestra F1 registra la mayor cantidad de enterobacterias en UFC/ml. (3.87×10^4 UFC/ml) comparada con la muestra F2 (con 3.75×10^3 UFC/ml).

TMTC: TOO MUCH TO COUNT (Muchas para contar)

TABLA 11
RECUENTO DE PLACA Y CRECIMIENTO DE BACTERIAS. MUESTRA F1.

F1: Muestra Fecal 1	Recuento Original – Agar Sangre		Recuento Original – Agar Mc Conkey	
	Diluciones	UFC	Diluciones	UFC
	-9	0	-9	0
	-8	0	-8	1
	-7	2	-7	2
	-6	27	-6	23
	-5	TMTC	-5	TMTC
	-4	TMTC	-4	TMTC
	-3	TMTC	-3	TMTC
	-2	TMTC	-2	TMTC
	-1	TMTC	-1	TMTC

TABLA 12
CALCULOS BASADOS EN EL RECUENTO MICROBIANO F1

Cálculos basados en el recuento microbiano F1.	
Dilucion -6	Dilucion -6
27 UFC per 0.1 ml	23 UFC per 0.1 ml
270 UFC per 1 ml	230 UFC per 1 ml
2.7 E+2 UFC per 1 ml	2.3 E+2 UFC per 1 ml
2.7 E+7 UFC per 1 ml	2.3 E+7 UFC per 1 ml
13.5 E+7 UFC per 5 ml	11.5 E+7 UFC per 5 ml
1.35 E+8 UFC per 5 ml	1.15 E+8 UFC per 5 ml
Frasco 100 ml:	Frasco 100 ml:
1.35 E+8 UFC per 100 ml	1.15 E+8 UFC per 100 ml
1.35 E+6 UFC per 1 ml	1.15 E+6 UFC per 1 ml
3.375 E+6 UFC per 2.5 ml	2.875 E+6 UFC per 2.5 ml
3.375 E+6 UFC per 100 ml	2.875 E+6 UFC per 100 ml
3.375 E+4 UFC per 1 ml	2.875 E+4 UFC per 1 ml

TABLA 13:
RECUENTO DE PLACA Y CRECIMIENTO DE BACTERIAS. MUESTRA F2.

F2: Muestra Fecal 2	Recuento Original – Agar Sangre		Recuento Original – Agar Mc Conkey	
	Diluciones	UFC	Diluciones	UFC
	-9	0	-9	0
	-8	3	-8	0
	-7	13	-7	1
	-6	20	-6	12
	-5	24	-5	30
	-4	TMTC	-4	TMTC
	-3	TMTC	-3	TMTC
	-2	TMTC	-2	TMTC
	-1	TMTC	-1	TMTC

TABLA 14:
CALCULOS BASADOS EN EL RECUENTO MICROBIANO. MUESTRA F2.

Cálculos basados en el recuento microbiano.	
-5	-5
24 UFC per 0.1 ml	30 UFC per 0.1 ml
240 UFC per 1 ml	300 UFC per 1 ml
2.4 E+2 UFC per 1 ml	3 E+2 UFC per 1 ml
2.4 E+6 UFC per 1 ml	3 E+6 UFC per 1 ml
12 E+6 UFC per 5 ml	15 E+6 UFC per 5 ml
1.2 E+7 UFC per 5 ml	1.5 E+7 UFC per 5 ml
Flask 100 ml:	Frasco 100 ml:
1.2 E+7 UFC per 100 ml	1.5 E+7 UFC per 100 ml
1.2 E+5 UFC per 1 ml	1.5 E+5 UFC per 1 ml
3 E+5 UFC per 2.5 ml	3.75 E+5 UFC per 2.5 ml
3 E+5 UFC per 100 ml	3.75 E+5 UFC per 100 ml
3 E+3 UFC per 1 ml	3.75 E+3 UFC per 1 ml

Del mismo modo, los resultados del crecimiento de bacterias en las cepas aisladas (B1-4) mostraron diferencias en ambos medios de cultivo. (Tablas 15 - 22)

TABLA 15:
RECUENTO DE PLACA Y CRECIMIENTO DE BACTERIAS. MUESTRA B1.

B1: E. Coli	Recuento Original – Agar Mc Conkey		Recuento Final - Agar Mc Conkey	
	Diluciones	UFC	Diluciones	UFC
	-9	0	-9	0
	-8	0	-8	20
	-7	14	-7	132
	-6	74	-6	TMTC
	-5	TMTC	-5	TMTC
	-4	TMTC	-4	TMTC
	-3	TMTC	-3	TMTC
	-2	TMTC	-2	TMTC
	-1	TMTC	-1	TMTC

TABLA 16:
CALCULOS BASADOS EN EL RECUENTO MICROBIANO. MUESTRA B1

Cálculos basados en el recuento microbiano.	
-6	-7
74 UFC per 0.1 ml	132 UFC per 0.1 ml
740 UFC per 1 ml	1320 UFC per 1 ml
7.4 E+2 UFC per 1 ml	1.32 E+3 UFC per 1 ml
7.4 E+7 per 1 ml	
Frasco 100 ml: 7.4 E+5 UFC	Frasco de 100 ml: 1.32 E +9 UFC Crecimiento Microbiano: 1.3 E+9 UFC

TABLA 17

RECUENTO DE PLACA Y CRECIMIENTO DE BACTERIAS. MUESTRA B2.

B2: Bidifobacterium	Recuento Original – Agar Sangre		Recuento Final - Agar Sangre	
	Diluciones	UFC	Diluciones	UFC
	-9	0	-9	0
	-8	0	-8	0
	-7	0	-7	0
	-6	8	-6	0
	-5	39	-5	20
	-4	TMTC	-4	150
	-3	TMTC	-3	TMTC
	-2	TMTC	-2	TMTC
	-1	TMTC	-1	TMTC

TABLA 18:

CALCULOS BASADOS EN EL RECUENTO MICROBIANO. MUESTRA B2

Cálculos basados en el recuento microbiano.	
-6	-4
39 UFC per 0.1 ml	150 UFC per 0.1 ml
390 UFC per 1 ml	1500 UFC per 1 ml
3.90 E+2 UFC per 1 ml	1.5 E+3 UFC per 1 ml
3.90 E+7 UFC per 1 ml	1.5 E+6 UFC per 1 ml
Frasco 100 ml: 3.90 E+5 UFC	Frasco 100 ml: 1.5 E +6 UFC Crecimiento: 1.11 E+6 UFC.

TABLA 19:
RECUENTO DE PLACA Y CRECIMIENTO DE BACTERIAS. MUESTRA B3.

B3: Bacteroides	Recuento Original – Agar Sangre		Recuento Final - Agar Sangre	
	Diluciones	UFC	Diluciones	UFC
	-9	0	-9	0
	-8	0	-8	0
	-7	6	-7	0
	-6	27	-6	1
	-5	TMTC	-5	19
	-4	TMTC	-4	48
	-3	TMTC	-3	TMTC
	-2	TMTC	-2	TMTC
	-1	TMTC	-1	TMTC

TABLA 20:
CALCULOS BASADOS EN EL RECUENTO MICROBIANO. MUESTRA B3.

Cálculos basados en el recuento microbiano.	
-6	-4
27 UFC per 0.1 ml	48 UFC per 0.1 ml
270 UFC per 1 ml	480 UFC per 1 ml
2.7 E+2 UFC per 1 ml	4.8 E+2 UFC per 1 ml
2.7 E+7 UFC per 1 ml	4.8 E+5 UFC per 1 ml
Frasco 100 ml:	Frasco 100 ml:
2.7 E+5 CFU	4.8 E +5 UFC
	Crecimiento:
	2.1 E+5 CFU

TABLA 21:
RECUENTO DE PLACA Y CRECIMIENTO DE BACTERIAS. MUESTRA B4.

B4: Ruminococcus	Recuento Original – Agar Sangre		Recuento Final - Agar Sangre	
	Diluciones	UFC	Diluciones	UFC
	-9	0	-9	0
	-8	0	-8	0
	-7	0	-7	0
	-6	5	-6	3
	-5	20	-5	40
	-4	TMTC	-4	TMTC
	-3	TMTC	-3	TMTC
	-2	TMTC	-2	TMTC
	-1	TMTC	-1	TMTC

TABLA 22:
CALCULOS BASADOS EN EL RECUENTO MICROBIANO. MUESTRA B4.

Cálculos basados en el recuento microbiano.	
-5	-5
20 UFC per 0.1 ml 200 UFC per 1 ml 2.0 E+2 UFC per 1 ml 2.0 E+6 UFC per 1 ml	40 UFC per 0.1 ml 400 UFC per 1 ml 4 E+2 UFC per 1 ml 4 E+6 UFC per 1 ml
Frasco 100 ml: 2.0 E+4 UFC	Frasco 100 ml: 4 E +6 UFC Crecimiento: 3.9 E+6 UFC.

Lo que refiere a las cepas aisladas, todas mostraron un ascenso en su crecimiento, esto muestra que las bacterias siguieron normalmente su perfil de crecimiento.

Entre las cepas aislada, la E. Coli (B1) mostró la mayor cantidad de bacterias con 7.4 E+ 5 UFC al inicio de la manipulación y 1,32 E+ 9 UFC al final de la manipulación. Siendo el Ruminococcus (B4) la cepa aislada que obtuvo la menor cantidad de

bacterias con 2.0 E+4 UFC al inicio de la manipulación, sin embargo mostró un aumento a lo largo de la manipulación terminando con 4.0 E+ 6 UFC.

Las combinaciones de bacterias (C1-2) mostraron de la misma manera, un perfil ascendente en su crecimiento, obteniendo resultados diferentes para cada una de ellas. (Tablas 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 y 32.)

TABLA 23:
RECUENTO DE PLACA Y CRECIMIENTO DE BACTERIAS. MUESTRA C1:
BACTEROIDES.

C 1 (Bacteroides)	Recuento Original – Agar Sangre		Recuento Final - Agar Sangre	
	Diluciones	UFC	Diluciones	UFC
	-9	0	-9	0
	-8	0	-8	1
	-7	8	-7	2
	-6	35	-6	16
	-5	TMTC	-5	52
	-4	TMTC	-4	TMTC
	-3	TMTC	-3	TMTC
	-2	TMTC	-2	TMTC
	-1	TMTC	-1	TMTC

TABLA 24:
CALCULOS BASADOS EN EL RECUENTO MICROBIANO. MUESTRA C1:
BACTEROIDES.

Cálculos basados en el recuento microbiano.	
-6	-5
35 UFC per 0.1 ml 350 UFC per 1 ml 3.5 E+2 UFC per 1 ml 3.5 E+7 UFC per 1 ml 10.5 +7 UFC per 3 ml Frasco 100 ml: 10.5 E+5 UFC 1.05E +6 UFC	52 UFC per 0.1 ml 520 UFC per 1 ml 5.2 E+2 UFC per 1 ml 5.2 E+6 UFC per 1 ml Frasco 100 ml: 5.2 E +6 UFC Crecimientol: 4.1 E+6 UFC

TABLA 25:
RECUENTO DE PLACA Y CRECIMIENTO DE BACTERIAS. MUESTRA C1: E.
COLI

C 1 (E.Coli)	Recuento Original – Mc Conkey		Recuento Final - Mc Conkey	
	Diluciones	UFC	Diluciones	UFC
	-9	0	-9	0
	-8	0	-8	1
	-7	0	-7	2
	-6	20	-6	14
	-5	TMTC	-5	52
	-4	TMTC	-4	TMTC
	-3	TMTC	-3	TMTC
	-2	TMTC	-2	TMTC
	-1	TMTC	-1	TMTC

TABLA 26:
CALCULOS BASADOS EN EL RECUENTO MICROBIANO. MUESTRA C1: E.
COLI

Cálculos basados en el recuento microbiano.	
-6	-5
20 UFC per 0.1 ml 200 UFC per 1 ml 2 E+2 UFC per 1 ml 2 E+7 UFC per 1 ml Frasco 100 ml: 2 E+5 UFC	52 CFU per 0.1 ml 520 CFU per 1 ml 5.2 E+2 CFU per 1 ml 5.2 E+6 per 1 ml Frasco 100 ml: 5.2 E +6 UFC Crecimiento: 5 E+6 UFC

La C1 muestra en sus resultados una clara diferencia entre el crecimiento de la E. Coli y el Bacteroides.

Al inicio de la manipulación, la cepa de Bacteroides muestra un mayor crecimiento que la cepa de E. Coli, sin embargo al finalizar la manipulación, las dos cepas logran un crecimiento parecido

En el caso de C2, sus resultados también difieren entre las bacterias involucradas.
(Tablas 27 - 32)

TABLA 27:

RECUENTO DE PLACA Y CRECIMIENTO DE BACTERIAS. MUESTRA C2: E.
COLI

C 2 E.Coli	Recuento Original – Agar Mc Conkey		Recuento Final – Agar Mc Conkey	
	Diluciones	UFC	Diluciones	UFC
	-9	0	-9	0
	-8	0	-8	0
	-7	0	-7	0
	-6	1	-6	24
	-5	42	-5	146
	-4	TMTC	-4	TMTC
	-3	TMTC	-3	TMTC
	-2	TMTC	-2	TMTC
	-1	TMTC	-1	TMTC

TABLA 28:

CÁLCULOS BASADOS EN EL RECUENTO MICROBIANO. MUESTRA C2: E.
COLI

Cálculos basados en el recuento microbiano.	
-5	-6
42 UFC per 0.1 ml	24 UFC per 0.1 ml
420 UFC per 1 ml	240 UFC per 1 ml
4.2 E+2 UFC per 1 ml	2.4 E+2 UFC per 1 ml
4.2 E+6 UFC per 1 ml	2.4 E+7 UFC per 1 ml
Frasco 100 ml: 4.2 E+4 UFC	Frasco 100 ml: 2.4 E +7 UFC Crecimiento: 2.3 E+7 UFC

TABLA 29:
RECUENTO DE PLACA Y CRECIMIENTO DE BACTERIAS. MUESTRA C2:
BACTEROIDES..

C 2: Bact	Recuento Original – Agar Sangre		Recuento Final - Agar Sangre	
	Diluciones	UFC	Diluciones	UFC
	-9	0	-9	0
	-8	0	-8	4
	-7	1	-7	5
	-6	30	-6	11
	-5	TMTC	-5	132
	-4	TMTC	-4	TMTC
	-3	TMTC	-3	TMTC
	-2	TMTC	-2	TMTC
	-1	TMTC	-1	TMTC

TABLA 30:
CALCULOS BASADOS EN EL RECUENTO MICROBIANO. MUESTRA C2:
BACTEROIDES

Cálculos basados en el recuento microbiano.	
-6	-5
30 UFC per 0.1 ml 300 UFC per 1 ml 3.0 E+2 UFC per 1 ml 3.0 E+7 UFC per 1 ml 9.0 E+7 UFC per 3 ml Frasco 100 ml: 9.0 E+5 UFC	132 UFC per 0.1 ml 1320 UFC per 1 ml 1.32 E+3 UFC per 1 ml 1.32 E+7 UFC per 1 ml Frasco 100 ml: 1.32 E +7 UFC Crecimiento: 1.23 E+7 UFC.

TABLA 31:
RECUENTO DE PLACA Y CRECIMIENTO DE BACTERIAS. MUESTRA C2:
RUMINOCOCCUS

C 2: Rum.	Recuento Original – Agar Sangre		Recuento Final - Agar Sangre	
	Diluciones	UFC	Diluciones	UFC
	-9	0	-9	0
	-8	0	-8	0
	-7	1	-7	0
	-6	34	-6	8
	-5	TMTC	-5	119
	-4	TMTC	-4	TMTC
	-3	TMTC	-3	TMTC
	-2	TMTC	-2	TMTC
	-1	TMTC	-1	TMTC

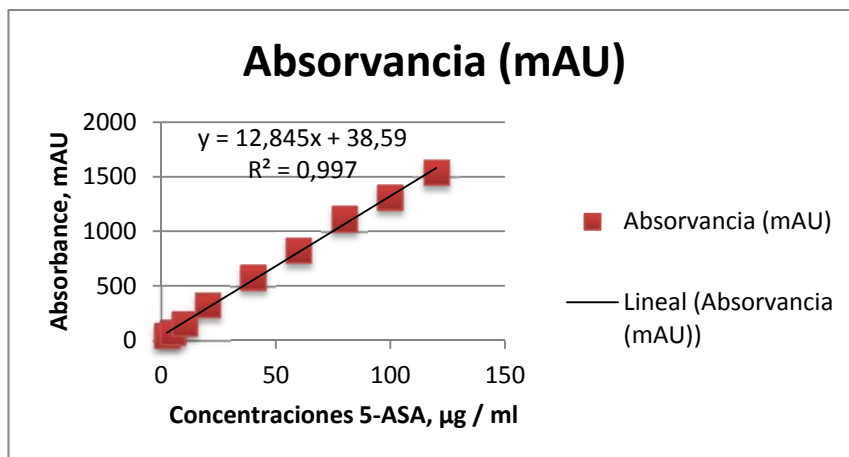
TABLA 32:
CALCULOS BASADOS EN EL RECUENTO MICROBIANO. MUESTRA C2:
RUMINOCOCCUS

Cálculos basados en el recuento microbiano.	
-6	-5
34 UFC per 0.1 ml	119 UFC per 0.1 ml
340 UFC per 1 ml	1190 UFC per 1 ml
3.4 E+2 UFC per 1 ml	1.19 E+3 UFC per 1 ml
3.4 E+7 UFC per 1 ml	1.19 E+7 UFC per 1 ml
10.2 E+7 UFC per 3 ml	
Frasco 100 ml: 10.2 E+5 UFC 1.02 E+6 UFC	Frasco 100 ml: 1.19 E +7 UFC Crecimiento: 1.08 E+7 UFC

En esta combinación, la cepa de Ruminococcus es la que muestra el mayor recuento

de bacterias entre las tres cepas combinadas, al inicio de la manipulación. Sin embargo al terminar la manipulación la cepa de E. Coli es la que obtuvo mayor crecimiento.

La figura 24 muestra la curva de calibración y el cromatograma que permitieron la cuantificación del 5ASA por HPLC.



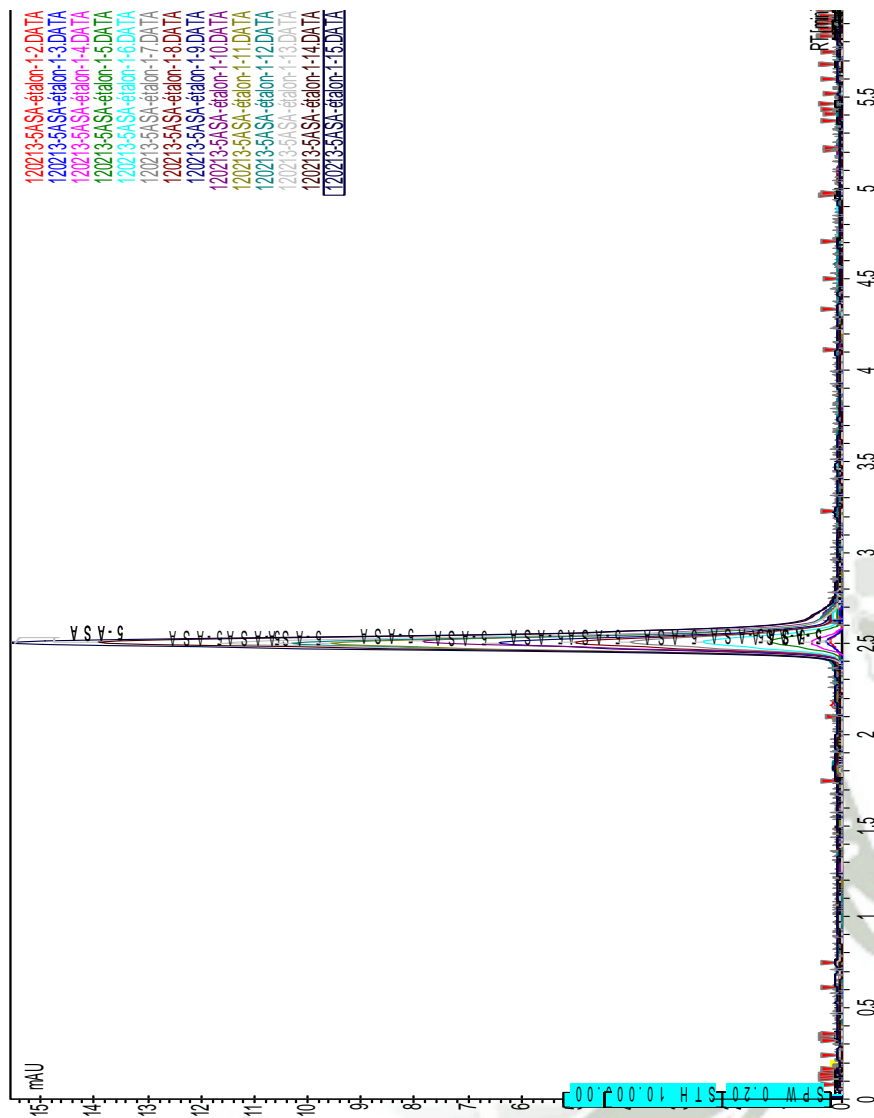


Figura 24: Curva de calibración y cromatograma del 5asa analizados

en el laboratorio de farmacotecnia de la Universidad Lille 2

Los resultados de porcentaje de liberación del fármaco obtenidos por HPLC para cada una de las muestras evaluadas demostraron un aumento en la liberación de la droga luego de la introducción de la o las bacterias, es decir luego de las doce horas de análisis. (Tablas 33 - 40) Sin embargo, la velocidad y el grado en que se produjo la liberación del fármaco varían entre todas las muestras.

TABLA 33
DATOS DE LIBERACION DE DROGA. MUESTRA B1

B1: E.Coli		
TIEMPO	PROMEDIO	D.S.

(horas)	(3 determinaciones)	
0.00	0.00	0.00
2.00	0.00	0.00
10.00	10.28	1.73
12.50	21.42	6.78
14.50	22.34	7.25
30.50	29.40	6.63
32.50	33.06	7.36
34.50	32.09	3.74
36.50	32.83	2.30
38.50	33.28	1.85
54.50	37.76	5.21
56.50	38.05	3.92

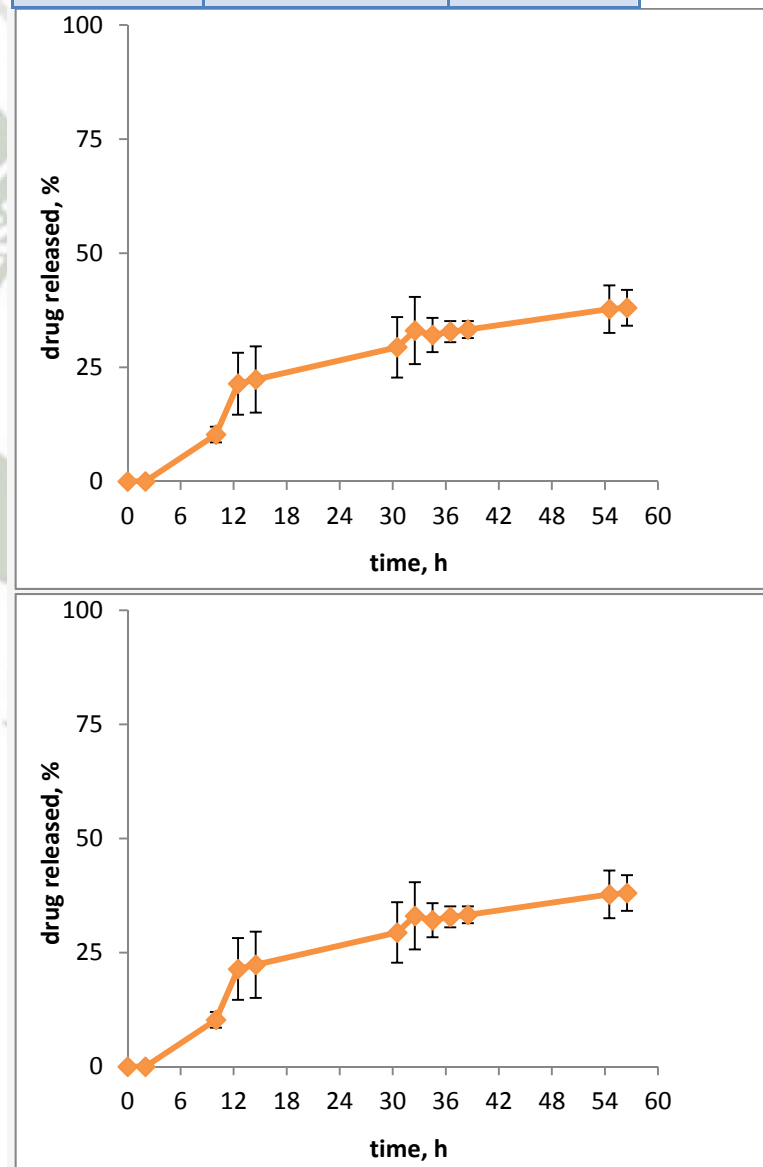


Figura 25: Datos del porcentaje de liberación de droga en el tiempo

determinado para la muestra B1.

TABLA 34

DATOS DE LIBERACION DE DROGA. MUESTRA B2

B2: Bifidobacterium		
TIEMPO (horas)	PROMEDIO (3 determinaciones)	D.S.
0.00	0.00	0.00
2.00	12.90	5.14
4.00	47.11	16.34
10.00	57.67	27.20
12.00	55.31	25.43
14.00	58.04	32.12
16.00	55.93	21.22
32.00	61.28	25.28
34.00	68.43	29.80
36.00	62.77	18.38
38.00	59.79	14.93
40.00	73.77	36.88
56.00	60.58	20.12
57.00	58.38	22.67

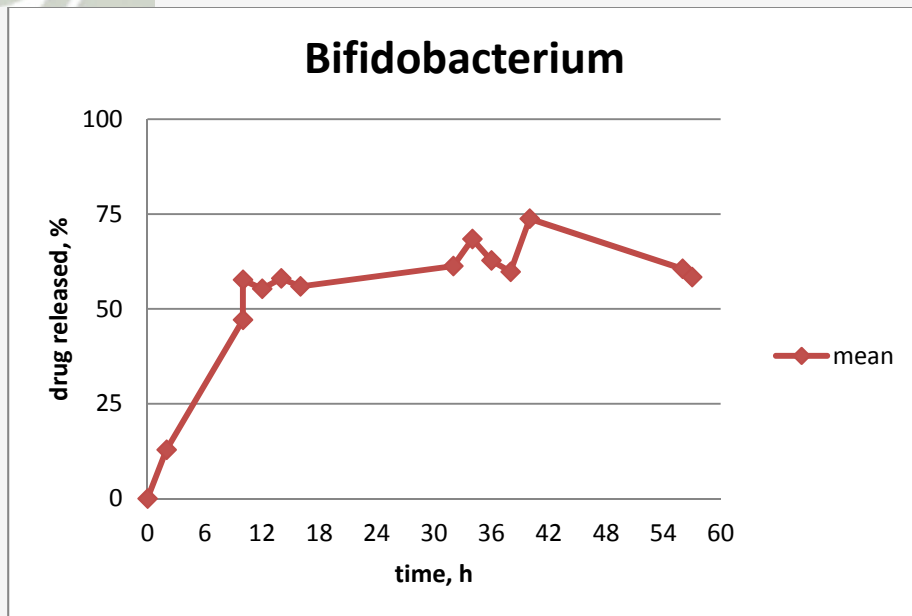
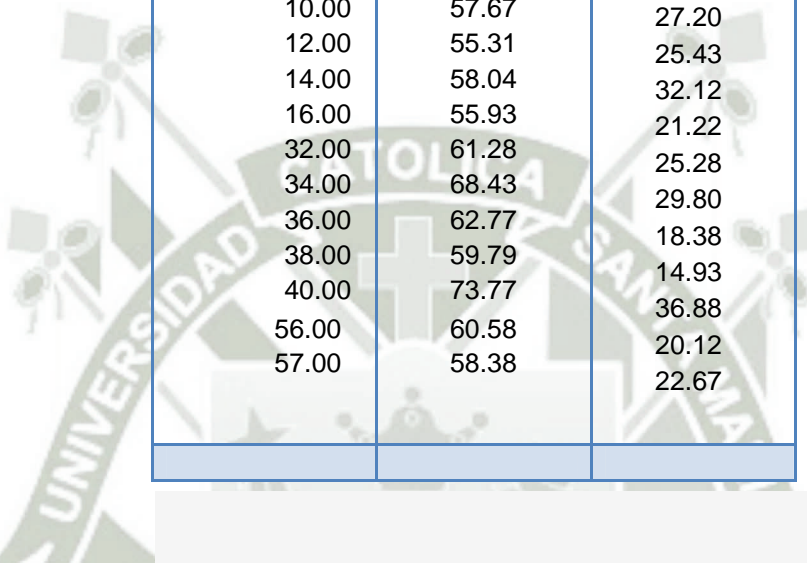


Figura 26: Datos del porcentaje de liberación de droga en el tiempo determinado para la muestra B2.

TABLA 35
DATOS DE LIBERACION DE DROGA. MUESTRA B3

B3: Bacteroides		
TIEMPO (horas)	PROMEDIO (3 determinaciones)	D.S.
0.00	0.00	0.00
2.00	0.00	0.00
10.00	4.30	0.21
12.00	6.71	1.45
14.00	7.57	1.38
16.00	8.61	1.87
32.00	12.34	5.20
34.00	13.01	4.85
36.00	15.04	4.10
38.00	17.38	4.43
40.00	20.84	5.13
56.00	24.13	6.12

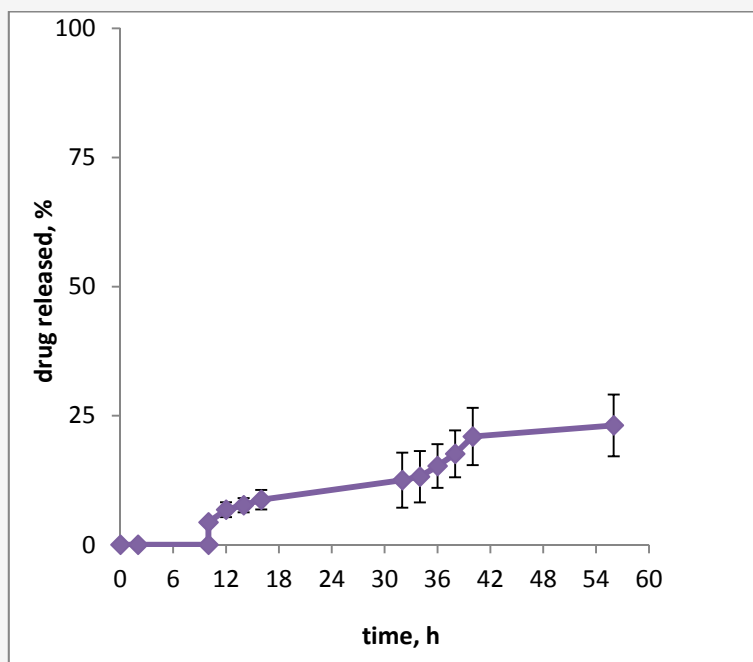


Figura 27: Datos del porcentaje de liberación de droga en el tiempo determinado para la muestra B3.

TABLA 36
DATOS DE LIBERACION DE DROGA. MUESTRA B4

B4: Ruminococos		
TIEMPO (horas)	PROMEDIO (3 determinaciones)	D.S.
0.00	0.00	0.00
2.00	0.00	0.00
10.00	4.08	1.47
13.00	4.82	3.51
15.00	7.40	1.51
31.00	12.20	3.08
33.00	13.13	2.36
35.00	11.97	5.01
37.00	14.51	3.11
39.00	15.78	4.13
55.00	19.70	4.17
57.00	20.09	3.98

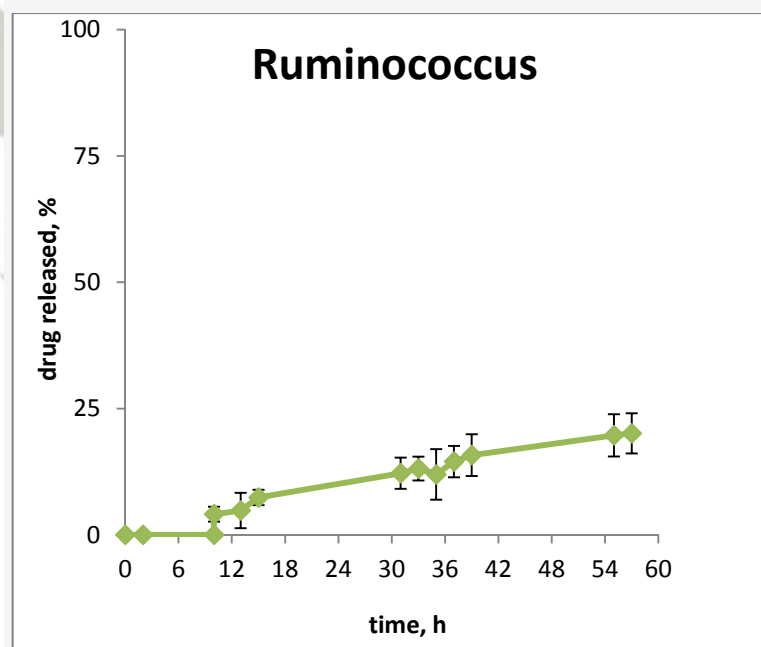


Figura 28: Datos del porcentaje de liberación de droga en el tiempo determinado para la muestra B4.

TABLA 37
DATOS DE LIBERACION DE DROGA. MUESTRA F1

F1: Muestra Fecal 1		
TIEMPO (horas)	PROMEDIO (3 determinaciones)	D.S.
0.00	0.00	0.00
2.00	0.00	0.00
10.00	0.00	0.00
24.00	15.24	3.01
26.00	16.73	3.06
28.00	18.55	3.70
30.00	20.22	4.24
32.00	22.02	5.53
48.00	35.60	10.67
50.00	40.11	10.28

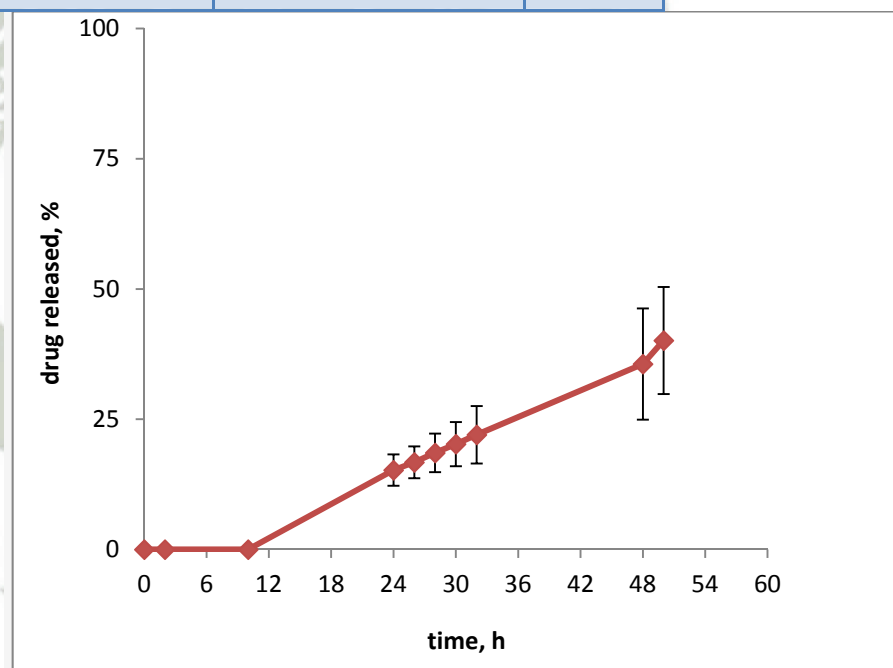


Figura 29: Datos del porcentaje de liberación de droga en el tiempo determinado para la muestra F1.

TABLA 38
DATOS DE LIBERACION DE DROGA. MUESTRA F2

F2: Muestra Fecal 2		
TIEMPO (horas)	PROMEDIO (3 determinaciones)	D.S.
0.00	0.00	0.00
2.00	2.54	2.20
10.00	8.85	7.67
16.00	21.75	6.49
18.00	16.96	14.89
20.00	23.89	5.61
22.00	25.07	5.42
24.00	25.91	7.79
40.00	41.42	6.66
42.00	44.82	6.40
44.00	46.81	6.87
46.00	48.27	6.95

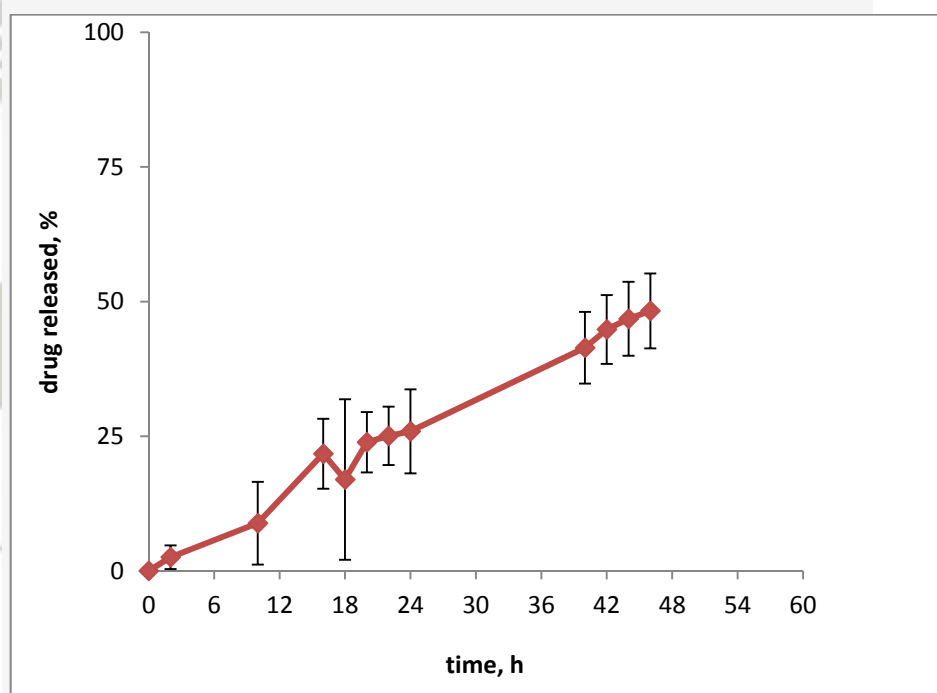


Figura 30: Datos del porcentaje de liberación de droga en el tiempo determinado para la muestra F2.

En el caso de las muestras fecales (F1-2) mostraron un incremento de 9% en la liberación total de la droga ,con un promedio de 44,19% \pm 12.78% ,comparado con el

promedio de las muestras aisladas (B1-4) que es de 35.08% ±13.84%.

TABLA 39

DATOS DE LIBERACION DE DROGA. MUESTRA C1

C1: Combinación 1(E. Coli y Bacteroides)		
TIEMPO (horas)	PROMEDIO (3 determinaciones)	D.S.
0.00	0.00	0.00
2.00	0.00	0.00
10.00	0.00	0.00
10.00	12.44	5.82
13.00	12.42	5.67
15.00	14.38	8.60
31.00	16.43	8.33
33.00	18.03	7.05
35.00	18.45	6.77
37.00	21.26	9.05
39.00	19.11	8.99
55.00	29.42	11.57
57.00	29.13	9.30

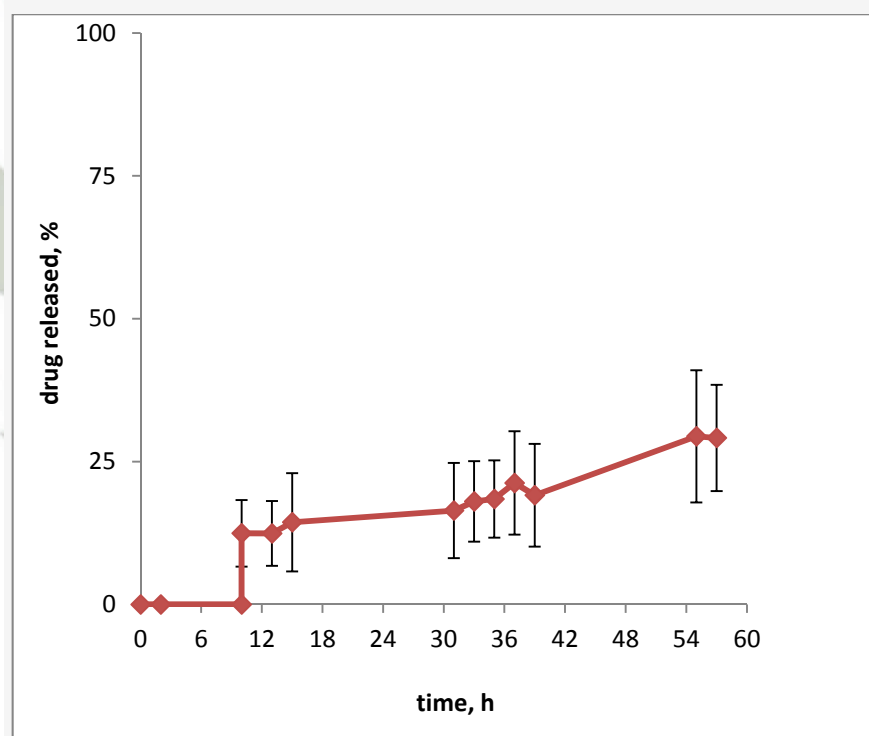


Figura 31: Datos del porcentaje de liberación de droga en el tiempo determinado para la muestra C1.

TABLA 40

DATOS DE LIBERACION DE DROGA. MUESTRA C2

C2: Combinación 2 (Bacteroides, E. Coli y Ruminococcus)		
TIEMPO (horas)	PROMEDIO (3 determinaciones)	D.S.
0.00	0.00	0.00
2.00	0.00	0.00
10.00	0.00	0.00
10.00	5.91	1.58
12.00	8.39	3.40
14.00	15.15	11.27
16.00	14.86	10.62
32.00	21.30	9.90
34.00	21.37	8.15
36.00	22.37	7.09
38.00	24.14	7.05
40.00	23.50	4.15
56.00	35.33	11.94

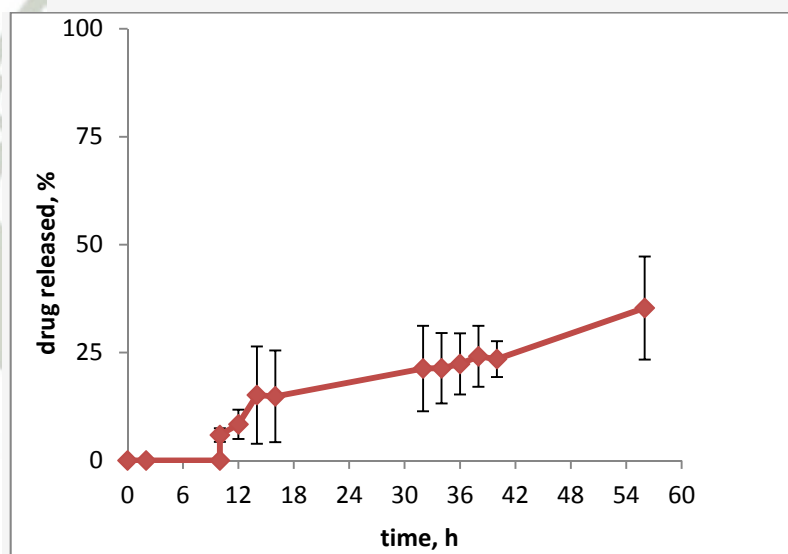


Figura 32: Datos del porcentaje de liberación de droga en el tiempo determinado para la muestra B4.

Las muestras C1-2 muestran un bajo porcentaje de liberación total, con un promedio de $31,08 \pm 11.75\%$.

Los resultados obtenidos para la muestra B2 fueron notablemente diferentes a todas las demás muestras con un porcentaje de liberación total de fármaco de $73,77\%$

$\pm 36.88\%$. El cual excede en 25.50% al siguiente más alto porcentaje de liberación. La combinación C1 fue seleccionada basada en los resultados de los porcentajes de liberación de las muestras aislada B1 y B3, con la intención de crear un perfil de liberación que se asemeje al perfil de las muestras fecales. Con la misma intención, se selecciono tres muestras aisladas (B1, B3 Y B4) para crear la combinación C2. Los perfiles de liberación obtenidos en las combinaciones C1 y C2 fueron mucho más bajos de lo esperado.

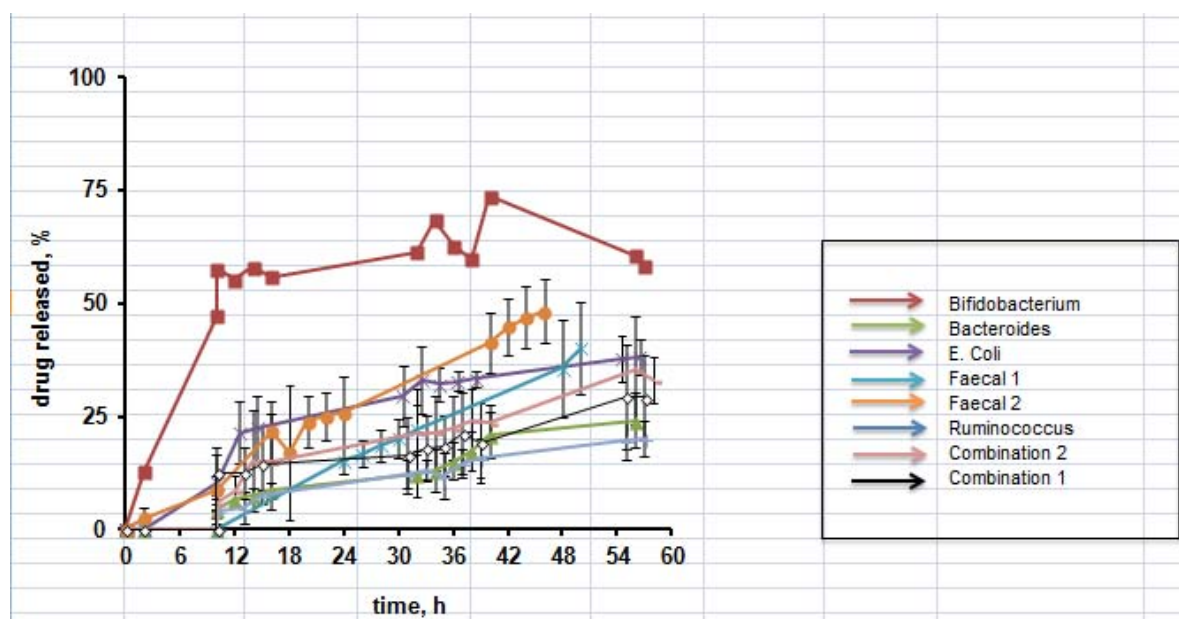


Figura 33: Comparación de porcentaje de liberación de las ocho muestras analizadas.

La figura 33 muestra la comparación de porcentajes de liberación entre las ocho muestras analizadas, las cuatro cepas aisladas, las dos muestras fecales y las dos combinaciones. Resalta el resultado del Bifidobacterium que llega a liberar más del 50% y el del Ruminococcus que llega a liberar menos del 25%.

2. DISCUSION

El desarrollo de nuevas opciones de tratamiento para las EII es un área que atrae mucho interés debido a los claros beneficios que se pueden obtener a partir de los métodos de la entrega de drogas específica al colon.

De esta manera, las EII se ven beneficiadas, mejorando el perfil de seguridad de fármacos tales como 5-ASA mediante la reducción de la absorción sistémica.

Sin embargo, el desarrollo de estos tratamientos es lento, ya que son necesarios ensayos in vitro para dar resultados claros, confiables y reproducibles que se puedan vincular al verdadero ambiente colónico.

La recreación del TGI para ensayos in vitro, muchos otros factores inter-pacientes como el pH, el tiempo de tránsito y microflora deben tenerse en cuenta.

Fue de mucha importancia para esta investigación, desarrollar una manera de reproducir la microflora típica observada en los pacientes con EII para poner a prueba la capacidad de liberación de fármaco in vitro usando los polisacáridos del recubrimiento de los pellets de 5-ASA.

Si los perfiles de liberación del fármaco pueden ser reproducidos usando una mezcla diseñada en el laboratorio, entonces se podría decir que este método ha llegado a replicar la microflora típica del colon de los pacientes con EII y de esta manera, reducir la necesidad de depender de las muestras fecales frescas.

Mirando los resultados obtenidos en esta investigación se puede concluir que los recubrimientos de los polisacáridos Dextrina (Nutriosa): Etilcelulosa 1:4, son degradados por las enzimas de las bacterias colónicas a extensiones definidas pero variadas.

Algunas muestras como la muestra B2 fueron capaces de liberar más de la mitad de 5-ASA a partir de los pellets, mientras que otras muestras como la muestra B4 libera la droga más lento y en menor medida.

No existe ningún par de muestras que dan el mismo perfil de liberación aunque, con la excepción de la muestra B2, todas las muestras liberaron menos del 49% del total del fármaco en 60 horas.

Sin embargo, la variación entre los diferentes perfiles de liberación de las muestras es bastante amplia con el perfil más bajo de liberación de la muestra B4 con un porcentaje

de $20,09 \pm 3,98\%$ y el perfil más alto correspondiente a la muestra B2 con un porcentaje de $73,77 \pm 22,67\%$.

Se esperaba esta variación entre las diferentes cepas a causa de la diferencia de la velocidad de crecimiento y de la producción de enzimas de las bacterias. Sin embargo, los cálculos de la desviación estándar mostraron que existía una gran variación entre los frascos de la misma muestra. La más notable es la muestra B2 que a las 40 horas obtuvo una porcentaje de liberación de $73,77 \pm 36,88\%$.

Según las tablas 33-40 de los RESULTADOS, la desviación estándar fue consistentemente alta para muchas de las muestras. Esto podría ser debido a errores experimentales, aunque se tomó gran cuidado con la metodología para asegurar que todas las muestras fueron tratadas con el mismo método descrito.

Es importante señalar que la cantidad total de fármaco fue evaluada mediante la trituración de los pellets en los frascos que contenían la muestra, es por esto que la cantidad calculada podría ser fácilmente afectada por la forma como los pellets fueron triturados, por la dificultad que causo la opacidad de los frascos y/o el pequeño tamaño de los pellets.

Las muestras de todos los frascos de ensayo se utilizaron para inocular placas de cultivo con el fin de ver qué efecto tenían los pellets en las bacterias. Todas las cepas analizadas mostraron un crecimiento considerable durante el periodo de prueba como se describe en la sección de los resultados.

De las dos muestras fecales analizadas, se vieron diferencias claras entre las cepas y el recuento de bacterias presentes. Es difícil hacer comentarios sobre cualquier tendencia o posible resultado anómalo con solo dos muestras, ya que el único detalle dado por los pacientes quienes dieron las dos muestras usadas en esta investigación fue la enfermedad en sí, sea Enfermedad de Crohn o Colitis ulcerosa. Sin contar con factores como el reciente uso de antibióticos, la elección del tratamiento, enfermedades concurrentes o incluso la dieta han podido potencialmente tener un impacto en la colonización de las cepas bacterianas del colon de los pacientes.

Si las diferencias vistas en las muestras probadas en esta investigación son típicas de los pacientes con EII, entonces una sola mezcla de bacterias no puede enfocarse estrechamente.

Los resultados de las muestras fecales podrían haber sido ligeramente alterados si las heces frescas todavía contenían polisacáridos residuales, en el caso que se hayan introducido en el material utilizado durante el ensayo.

En caso de las muestras fecales, las muestras F1-2 no mostraron una diferencia notable en sus perfiles de liberación de fármaco. Esto nos sugiere que las diferencias no fueron dependientes de las condiciones de los pacientes con EII.

Las muestras de cepas aisladas que se analizaron, no producen perfiles de liberación de fármaco parecidos a los perfiles producidos por la materia fecal, pero se quería probar que mediante el uso de los resultados obtenidos a partir de estas muestras, se podría dar lugar a una combinación de dos muestras B1 y B3, como muestra C1, y una combinación de tres muestras B1, B3, B4, las cuales hacen la muestra de C2.

Se consideró que mediante la combinación de estas dos o tres cepas, respectivamente, se produciría un perfil de liberación de droga parecido o superior cuantitativamente a los resultados de los perfiles de cada cepa aislada. Sin embargo, los perfiles producidos fueron inesperadamente bajos.

C1: El porcentaje y la velocidad de liberación del fármaco no hacen a este perfil uno de los más bajos ensayados, como se describe en la sección de resultados, pero mostraron poca comparación con la muestra B3 y casi todos los resultados obtenidos fueron inferiores a los obtenidos para la muestra B1.

C2: Del mismo modo, ni el porcentaje ni la velocidad de liberación del fármaco hacen que este sea el caso de liberación más baja, pero también mostró poca comparación a la muestra B1 y los resultados obtenidos fueron inferiores a los obtenidos para las muestras B3 y B4.

Esto puede ser debido a errores experimentales, ya sea durante las pruebas o el análisis. El periodo de tiempo durante el cual las muestras fueron probadas y analizadas fue extendido aproximadamente hasta las 60 horas, con el periodo de tiempo exacto dependiendo de la cepa bacteriana utilizada.

A las bacterias de desarrollo lento se les dio un tiempo de muestreo más largo con el fin de permitir que se produzca el crecimiento. Las cepas aisladas se cultivaron en el laboratorio 24 horas antes de ser utilizadas, sin embargo, las muestras fecales se utilizaron frescas, es decir las bacterias que residen en colonias establecidas en el

colon.

El largo período de prueba también es responsable de la longitud de tiempo que puede tomar para el tránsito a lo largo de todo el tracto gastrointestinal.

La competencia inesperada entre las bacterias aisladas también podría ser la causal de este problema, pero cuando se observaron las placas de cultivo de las muestras tomadas, se encontró cantidades de crecimiento similares, por lo que es poco probable.

Uno de los grandes problemas encontrados en esta investigación, fue la obtención de muestras fecales de pacientes con EII. Por esta razón es que solo dos muestras fecales fueron probadas en este estudio. La razón de este problema fue principalmente la dificultad de la obtención de muestra. A muchos pacientes se les pregunto colaborar cada semana, y aunque todos dijeron estar dispuestos, solo dos lo hicieron.

Muchos pacientes olvidaron o se avergonzaron de proporcionar las muestras. Esto pone de relieve la importancia de desarrollar una mezcla bacteriana que pueda representar y sustituir a la microflora colónica de pacientes con EII. Mejores resultados se hubieran podido ver al tener más muestras para analizar.

Si el tiempo lo hubiera permitido, se hubieran repetido los análisis de las combinaciones para descartar los errores u otra posibilidad hubiera sido hacer nuevos análisis de diferentes combinaciones.

Aunque esta investigación no logró todos sus objetivos y metas originales, ha sentado las bases para una mayor investigación a continuar. Gracias a las consideraciones discutidas anteriormente, es factible que una mejor combinación pueda ser desarrollada. Esta investigación careció de tiempo y por lo tanto, careció también de muestras necesarias para identificar las tendencias y diferencias clave, que por evidencia son las muestras fecales. Sin una mezcla bacteriana estandarizada, el ensayo de nuevas posibilidades de tratamiento que implican la focalización en el colon para la liberación del fármaco permanecerá dificultoso y a largo tiempo.

Es poco probable que la obtención de muestras fecales frescas regulares de los pacientes adecuados será de mayor accesibilidad y siempre existirán las variaciones

inter-pacientes que afecten la reproducibilidad de los resultados.

Hasta que nuevos y novedosos tratamientos dirigidos a la entrega específica de fármacos puedan ser desarrollados, la farmacoterapia usada para las EII continuará siendo limitada por los efectos secundarios que estas drogas a menudo causan.



CONCLUSIONES

La flora identificada del colon a partir de las dos muestras fecales analizadas de pacientes con EII está conformada por bacterias anaerobias como *Citrobacter diversus*,

Proteus mirabilis, Escherichia Coli, Staphilococcus, Enterococcus, Clostridium Ramosum, Veillonella, Bifidobacterium, Rumminococcus y Bacteroides Ovatus.

De la flora bacteriana hallada en las dos muestras fecales, mediante pruebas bioquímicas se lograron aislar las siguientes bacterias glicolíticas: *Escherichia Coli, Bifidobacterium, Bacteroides Ovatus y Ruminococcus*; con el fin de investigar su impacto sobre la degradación de los pellets de 5 ASA

Los resultados de liberación del principio activo, se dieron analizando las ocho muestras por HPLC. Las dos muestras fecales (F1, F2) dieron como resultado una liberación de 40.11% y 48,27% respectivamente. Mientras que las cepas bacterianas aisladas tuvieron una liberación variada: La E. Coli liberó en un 38.05% el principio activo; La cepa de Bifidobacterium logró una liberación de 73.77% del principio activo, siendo la muestra que logro la liberación más alta en esta investigación; Para el caso del Bacteroides Ovatus, éste solo libero en un 24% el principio activo; y por último la cepa del Ruminococcus, la cual liberó 20.09% del principio activo, lo cual indica que es la bacteria con menos capacidad de liberar el principio activo en esta investigación. Para el caso de las dos combinaciones (C1, C2), los perfiles de liberación no fueron los esperados, logrando una liberación de 29.17% y 35.33% respectivamente.

Se esperó que las combinaciones de bacterias tuvieran perfiles de liberación del principio activo superiores a aquellos dados por las cepas aisladas, sin embargo al comparar el perfil de liberación entre las combinaciones y las cepas aisladas, se pudo observar que las combinaciones no logran dar un mayor porcentaje de liberación.

REFERENCIAS

1. Altamash I. Quresh, Russell D. Cohenb. (2005) Mesalamine delivery systems: do they really make much difference?. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (2005) 281– 302
2. Baumgart D. C. & Sandborn W. J. (2007) Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies.
3. Borlioux P., Braesco V., Koletzko B., Guarner F. (2003) The intestine and its microflora are partners for protection of the host. 1414-1427.
4. Dubey R., Dubey R., Omrey P., Vyas S. P. & Jain S. K. (2010) Development and characterisation of colon specific drug delivery system bearing 5-ASA and camylofine dihydrochloride for the treatment of ulcerative colitis. *Journal of Drug Targeting*, 18(8):589-601.
5. Elmer W. Koneman, Stephen D. Alleri, Wiliam M. Janda, Paul C. Schreckenberger, Washington C. Winn. (1999) *Diagnostico Microbiológico. Texto y Atlas color. V Edición. Editorial Médica Panamericana. Cap. I 2-5; Cap. IV 171-190; Cap XIV 687-754.*
6. Enrique Medina Benítez, Daniel Fuentes Lugo, Lucrecia Suárez Cortina, Gerardo Prieto Bozano. (2001) *Enfermedad Inflamatoria Intestinal. 18, 151-160.*
7. Forbes, Sahn, Weissfeld. Bailey & Scott. (2004) *Diagnostico Microbiológico. XI Edición. Editorial Médica Panamericana. 327- 334; 378-389.*
8. Friend D. R. (2005) New oral delivery systems for treatment of inflammatory bowel disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*.
9. Gang Cheng, Feng An, Mei-Juan Zou, Jin Sun, Xiu-Hua Hao, Yun-Xia He. (2004) Time- and pH-dependent colon-specific drug delivery for orally administered diclofenac sodium and 5-aminosalicylic acid. *World Journal*

Gastroenterol 2004;10(12):1769-1774

10. Gazzaniga A *et al.* (2006) Time-controlled oral delivery systems for colon targeting. *Expert Opinion Drug Delivery* 583–597.
11. Giaffer M.H. (1996) Labelled leucocyte scintigraphy in inflammatory bowel disease: Clinical applications. 38: 1-5.
12. Gisbert JP, Gomollon F., Maté J., Pajares J.M. (2002) Role of 5-aminosalicylic acid (5-ASA) in treatment of inflammatory bowel disease. A systematic review. 471-88.
13. Guardia A. (2006) Tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal. *Drugs of today*. (Supl. 7): 1-29
14. Guarner F. & Malagelada J.-R. (2003) Gut flora in health and disease. 361:512
15. Janice Aparecida Rafael, José Roberto Jabor, Rúbia Casagrande, Sandra Regina Georgetti, Maria de Fátima Borin, Maria José Vieira Fonseca. (2007) Validation of HPLC, DPPH• and nitrosation methods for mesalamine determination in pharmaceutical dosage forms. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 43, n. 1, jan./mar., 2007
16. Hentschel U., Dobrindt U. & Steinert M. (2003) Commensal bacteria make a difference. *Trends in Microbiology*, 11:148-50.
17. Jung Y. & Kim Y. M. (2010) What should be considered on design of a colon-specific prodrug?
18. K.V. Vinay Kumar, T. Sivakumar, T. Tamizh mani (2011) Colon targeting drug delivery system: A review on recent approaches *PharmaInterScience Publishers Department of Pharmaceutics*.

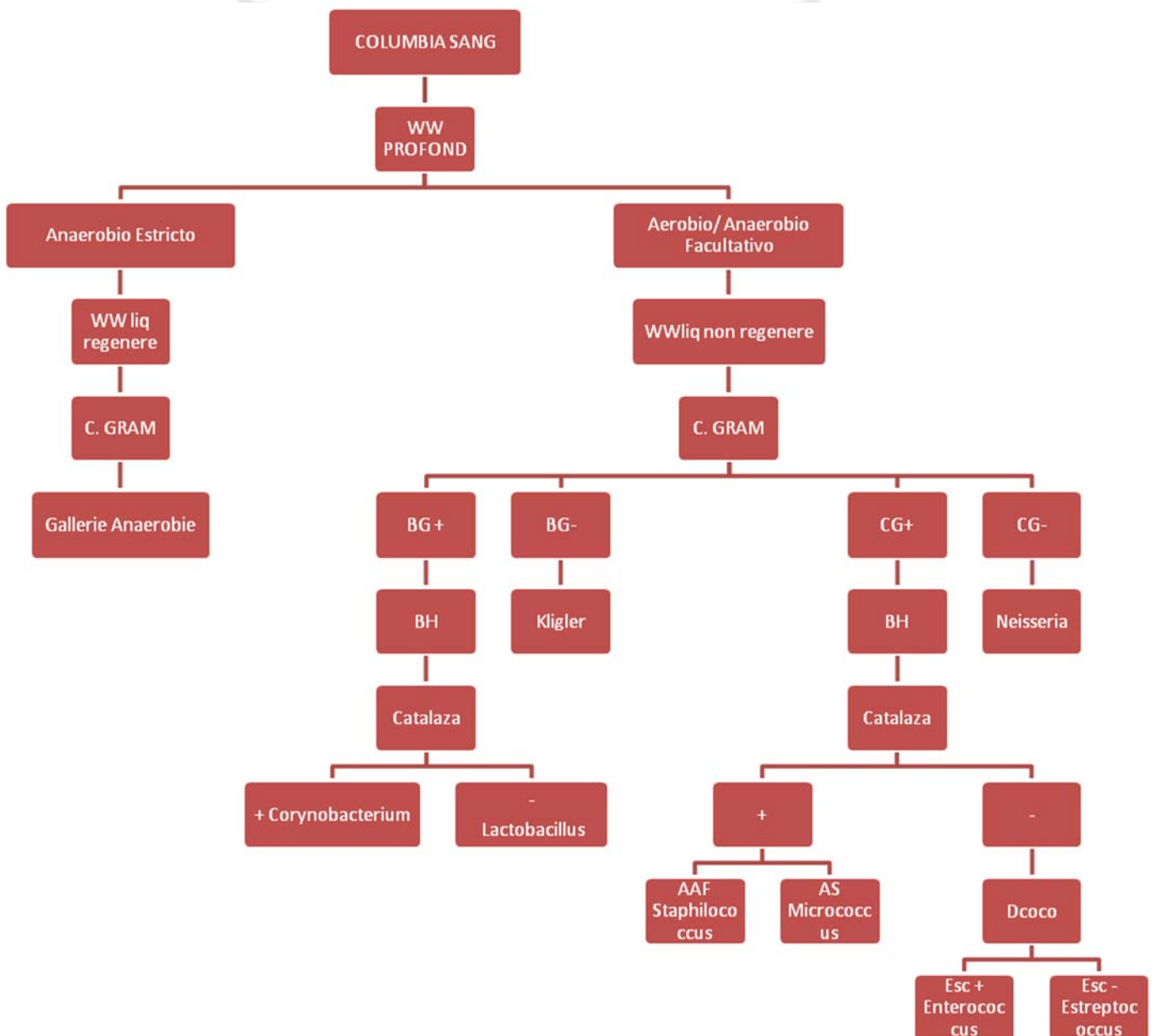
19. Karrouit Y., Neut C., Wils D., Siepmann F., Deremaux L., Desreumaux P. & Siepmann J. (2009a) Novel polymeric film coatings for colon targeting: How to adjust desired membrane properties. *International Journal of Pharmaceutics*.
20. Karrouit Y., Neut C., Wils D., Siepmann F., Deremaux L., Dubreuil L., Desreumaux P. & Siepmann J. (2009b) Colon targeting with bacteria-sensitive films adapted to the disease state. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*.
21. Karrouit Y., Neut C., Wils D., Siepmann F., Deremaux L., Flament M.-P., Dubreuil L., Desreumaux P. & Siepmann J. (2009c) Novel polymeric film coatings for colon targeting: Drug release from coated pellets. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*
22. Lecomte F., Siepmann J., Walther M., MacRae R.J., Bodmeier R., pH-Sensitive polymer blends used as coating materials to control drug release from spherical beads: elucidation of the underlying mass transport mechanisms, *Pharm. Res.* 22 (2005) 1129–1141.
23. Libo Yang, James S. Chu, Joseph A. Fix (2002) Colon-specific drug delivery: new approaches and in vitro/in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics* 235 (2002) 1–15
24. Mangin, I, Bonnet, R, Seksik, P, Rigottier-Gois L., Sutren M., Bouhnik Y., Neut C., Collins M. D., Colombel J.-F., Marteau P. & Doré J. (2004) Molecular inventory of faecal microflora in patients with Crohn's disease. *FEMS Microbiology Ecology*, 50:25-36.
25. MacFaddin (2003) Pruebas Bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Editorial Médica Panamericana III Edición. 451-673
26. Marteau P., Lepage P., Mangin I., Suau A., Dore J., Pochart P. et al. (2004) Review Article: Gut flora and inflammatory bowel disease. (Supl.4): 18-23.

27. Miguel Angel Gassull, Fernando Gomollón, Joaquín Hinojosa, Antoni Obrador. (2007) Enfermedad Inflamatoria Intestinal III Edición. España.
28. McConnell E. L., Liu F. & Basit A. W. (2009) Colonic treatments and targets: issues and opportunities. *Journal of Drug Targeting*, 17(5):335-363.
29. Muraoka M., Hu Z., Shimokawa T., Sekino S.-I., Kurogoshi R.-E., Kuboi Y., Yoshikawa Y. & Takada K. (1998) Evaluation of intestinal pressure-controlled Colon delivery capsule containing caffeine as a model drug in human volunteers. *Journal of Controlled Release*, 52:119-29.
30. Neut C., Bulois P., Desreumaux P., Membré J.M., Lederman E., Gambiez L., Cortot A., Quandalle P., van Kruiningen H., Colombel J.F., (2002) Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's Disease, *The American Journal of Gastroenterology*, 97:939-46.
31. Pertuit D., Moulari B., Betz T., Nadaradjane A., Neumann D., Ismaïli L., Refouvelet B., Pellequer Y. & Lamprecht A. (2007) 5-amino salicylic acid bound nanoparticles for the therapy of inflammatory bowel disease. *Journal of Controlled Release*, 123:211-8.
32. Rodríguez Antonio, Francesc Casellas, Malagelada Juan Ramón. (2008) Epidemiología de la enfermedad inflamatoria intestinal en el paciente de edad avanzada
33. S. Bondesen, Intestinal fate of 5-aminosalicylic acid: regional and systemic kinetic studies in relation to inflammatory bowel disease, *Pharmacol. Toxicol.* 81 (Suppl. 2) (1997) 1-28.
34. Sands B.E. (2004) Enfermedad de Crohn: Enfermedades gastrointestinales y hepáticas. VII Edición. Medica Panamericana. 2139- 2177.
35. Sicilia Beatriz, Vicente Raquel, Gomollón Fernando. (2009) Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa: discusión de la epidemiología clásica. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2009;39:135-145
36. Silverberg MK, Satsangi J, Ahmad T, Arnott I, Bernstein CN, Brant ST, et al. (2005) Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a working party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. 19 (Suppl A); 5A-36A

37. Wei H., Li-Fang F., Min B., Ying-Zhen C., Bai X., Qing D., Feng W., Min Q. & De- Ying C. (2009) Chitosan / Kollicoat SR 30D film-coated pellets of aminosaliclates for colonic drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99:186-95.
38. Yang L. (2008) Biorelevant dissolution testing of colon-specific delivery systems activated by colonic microflora. *Journal of Controlled Release*, 125:77-86.
39. Yang L., Chu J. S. & Fix J. A. (2002) Colon-specific drug delivery: new approaches and in vitro/in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 235:1-15.
40. Y. Meissner, A. Lamprecht, Alternative drug delivery approaches for the therapy of inflammatory bowel disease, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 2878–2891.
41. Yean Marie Reimund et al. (2009) Ulcerative Colitis associated colorectal cancer prevention by 5-ASA: Current Status and Perspectives. 149-166.
42. Yean Marie Reimund et al (2009) Colon cancer in inflammatory bowel disease: recent trends, questions and answers. 190-201.

ANEXO 1

FLUJOGRAMA DE IDENTIFICACION PARA LAS MUESTRAS FECALES



ANEXO 2

COLUMBIA AU SANG (AGAR SANGRE)

FUNDAMENTO

El **agar sangre** es una combinación de un agar base (agar nutritivo) con el agregado de 5 % de sangre de caballo, también puede usarse sangre humana, para cultivos en una placa de Agar. El agar sangre aporta muchos factores de enriquecimiento. Se usa también para ver la capacidad hemolítica de los microorganismos patógenos (que es un factor de virulencia).

INGREDIENTES

Base Columbia	42.5 g
Glucosa	5 g
Clorhidrato de L-Cisteína	0.3 mg
Agar	5 g
Sangre Desfibrinada de Caballo	5 ml
Agua Destilada	Csp.

PROCEDIMIENTO

Disolver la base Columbia, la glucosa, Clorhidrato de cisteína y el agar en 1 litro de agua destilada y llevarlo hasta su punto de ebullición. Ajustar el pH a 7.

Poner el medio en frascos de 100 ml para esterilizarlos en el autoclave por 15 minutos a 121°C. Antes de usar los frascos, mantenerlos en un horno de 80°C, mientras que la sangre desfibrinada de caballo es guardada en el frigidier a 2°C.

Usar una pipeta para añadir 5 ml de sangre a cada uno de los frascos con medio Columbia una vez que estos estén templados (aproximadamente 50°C).

Mezclar el agar con la sangre cuidadosamente con el fin de evitar coágulos.

Verter en placas petri. Dejar solidificar por 10 minutos.

ANEXO 3

AGAR WEST WILKINS PROFUNDO

FUNDAMENTO

El medio de cultivo, tiene por sus componentes la calidad nutricional de la triptona. Este permite el desarrollo de una amplia variedad de microorganismos, incluidos los nutricionalmente exigentes. Además, se observa que las bacterias estrictamente aerobias, crecen en la parte superior, mientras que las anaerobias facultativas o anaerobias estrictas crecen en las profundidades del medio. Las sustancias reductoras como la cisteína proporcionan una anaerobiosis suficiente y debido a los grupos -SH- de estos compuestos, se neutralizan los efectos bacteriostáticos de los derivados mercuriales, arsenicales y de otros metales pesados. La presencia de una baja cantidad de agar, retarda la dispersión de CO₂ y O₂.

COMPONENTES

Triptona	10 g
Gelatina de Peptona	10 g
Extracto de Levadura	5 g
Glucosa	3 g
Arginina	5 g
Piruvato de Sodio	5 g
Bicarbonato de Sodio	1 g
Clorhidrato de Cisteína	0.5 g
Tween 80 (5%)	5 ml
Hemina	10 ml
Vitamina k3	10 ml
Agar	4.5 g
Agua Destilada	c.s.p. 1 L.

PROCEDIMIENTO

Añadir al WEST WILKINS líquido 4,5 g/L de agar.

Finalmente, repartir el medio en tubos de 10 ml y autoclavar por 15 min a 120°C

ANEXO 4

AGAR WEST WILKINS LIQUIDO

FUNDAMENTO

En este medio de cultivo, la triptona aporta los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo de microorganismos. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, y el bicarbonato sódico otorga capacidad buffer. El extracto de levadura sirve como sustrato. Las sustancias reductoras como la cisteína proporcionan anaerobiosis. El polisorbato (Tween 80) es capaz de inactivar numerosas sustancias antimicrobianas neutralizando desinfectantes fenólicos. Este medio de cultivo, es utilizado para el crecimiento de bacterias nutricionalmente exigentes.

COMPONENTES

Triptona	10 g
Gelatina de Peptona	10 g
Extracto de Levadura	5 g
Glucosa	3 g
Arginina	5 g
Piruvato de Sodio	5 g
Bicarbonato de Sodio	1 g
Clorhidrato de Cisteína	0.5 g
Tween 80 (5%)	5 ml
Hemina	10 ml
Vitamina k3	10 ml
Agua Destilada	c.s.p. 1 L.

PROCEDIMIENTO

Disolver la triptona, la gelatina, el extracto de levadura, la glucosa, la arginina, el piruvato y bicarbonato de sodio, el clorhidrato de cisteína, la hemina disuelta en

100 ml de soda, la vitamina k3 disuelta en 100 ml de alcohol de 90°C, y por último, el tween 80 en 1 litro de agua destilada. Ajustar el pH A 7,2.

Finalmente, repartir el medio en tubos de 10 ml y autoclavar por 15 min a 120°C

ANEXO 5

AGAR VIANDE LEVURE (VL)

FUNDAMENTO

La triptona y los extractos de carne aseguran el crecimiento de microorganismos anaerobios. Normalmente la glucosa constituye el recurso energético de desarrollo, sin embargo en este caso, no se agregó glucosa con el fin de que las bacterias glicolíticas tengan como único recurso energético los polisacáridos.

COMPONENTES

Triptona	5 g
Cloruro de Sodio	2.5 g
Extracto de carne	1.5 mg
Extracto de levadura	3 g
Cisteína	0.3 g
Agua Destilada	Csp.1 L

PREPARACION

Disolver la triptona, el cloruro de sodio, el extracto de carne y el extracto de levadura y la cisteína en un litro de agua destilada. Si es necesario se debe ajustar el pH 7 (± 0.2).

Verter el medio en frascos de 100 ml y esterilizar en un autoclave por 20 minutos a 115°C. Mantener los frascos a temperaturas bajas hasta su utilización

ANEXO 6

SOLUCION DE RINGER

FUNDAMENTO

La solución de Ringer es una solución isotónica la cual se usa para hacer diluciones para el recuento de bacterias anaerobias.

COMPONENTES

Sol. de Ringer	50 ml
Sol. Resazurina Difco	0.8 ml
Metafosfato de Sodio	0.2 g
Clorhidrato de L-Cisteína	0.1 g
Agua Destilada	Csp.1 L

PROCEDIMIENTO

Disolver el metafosfato de sodio, el clorhidrato de L-cisteína con la solución de Ringer y la solución de resazurina Difco en 1 L de agua destilada.

Verter la solución en tubos de 10 ml.

Autoclavar 15 minutos a 121°C

Mantener a temperaturas altas antes de su uso.

ANEXO 7

TINCIÓN GRAM

FUNDAMENTO

De gran importancia en Microbiología porque permite diferenciar dos grandes grupos de bacterias (Gram+ y Gram-), según se comporten ante esta tinción.

El fundamento radica en la diferente estructura de la pared celular de ambos grupos: las bacterias Gram+ tienen una gruesa capa de peptidoglicano en su pared, mientras que las bacterias Gram- tienen una capa de peptidoglicano más fina y una capa lipopolisacáridica externa.

Procedimiento

- Colocar una gota de muestra en un portaobjetos
- Colocar Cristal Violeta cubriendo toda la muestra por 1 minuto.
- Lavar.
- Cubrir la muestra con Lugol.
- Lavar.
- Cubrir la muestra con alcohol acetona para decolorarla mediante 30 segundos.
- Agregar safranina cubriendo la muestra por 1 minuto.
- Lavar y secar.

TINCIÓN DE GRAM

Gram +	Pasos	Gram -
	Fijación	
	Colorante principal: cristal violeta	
	Mordiente: lugol	
	Decoloración: alcohol/acetona	
	Colorante de contraste: safranina	

ANEXO 8 GALERIA ANAEROBIA

BG-	CG+	CG-	BG+ Esporulado	BG+
WWliq	WWliq	Veillonella	WWliq	WWliq
Leche	Leche		Leche	Leche
Glucosa	Glucosa		Glucosa	Glucosa
Sacarosa	Sacarosa		Sacarosa	Sacarosa
Maltosa	Base		Lactosa	Lactosa
Glicerol	Nitrato		Maltosa	Glicerol
Manitol	WWprofon		Glicerol	Manitol
Base			Manitol	Almidon
Esculina			Almidon	Base
WWprofond			Base	Nitrato
			Esculina	WWprofond
			Nitrato	
			Gelatina	
			WWprofond	

ANEXO 9 PRUEBA CATALASA

FUNDAMENTO

La catalasa es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias. Descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. El desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno indica que la prueba es positiva.

MATERIAL Y REACTIVOS

- Portaobjetos
- Peróxido de Hidrogeno
- Asa de siembra
- Pipetas Pasteur

PROCEDIMIENTO

1. Colocar una gota de agua oxigenada sobre un portaobjeto con la ayuda de la pipeta Pasteur.
2. Suspender la bacteria.
3. Detectar la formulación de burbujas

ANEXO 10

KLIGER HIERRO AGAR

FUNDAMENTO

En el medio de cultivo, la peptona de carne y la tripteína, aportan los nutrientes adecuados para el desarrollo bacteriano. La lactosa y la glucosa son los hidratos de carbono fermentables. El tiosulfato de sodio es el sustrato necesario para la producción de ácido sulfhídrico, el citrato de hierro y amonio, es la fuente de iones Fe^{3+} , los cuales se combinan con el ácido sulfhídrico y producen sulfuro de hierro, de color negro. El rojo de fenol es el indicador de pH, y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. El agar es el agente solidificante. Por fermentación de azúcares, se producen ácidos, que se detectan por medio del indicador rojo de fenol, el cual vira al color amarillo en medio ácido. El tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrógeno el que reacciona luego con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro.

COMPONENTES

Fórmula (en gramos por litro)	
Peptona de carne	13.0
Cloruro de sodio	5.0
Lactosa	10.0
Tripteina	10.0

Glucosa	1.0
Citrato de hierro y amonio	0.5
Tiosulfato de sodio	0.3
Rojo de fenol	0.025
Agar	15.0
pH final: 7.3 ± 0.2	

PROCEDIMIENTO

Suspender 54.8 g del polvo por litro de agua destilada. Mezclar bien y calentar con agitación frecuente, hervir 1 o 2 minutos hasta disolución total. Llenar hasta la tercera parte de los tubos de ensayo. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Enfriar en pico de flauta profundo.

RESULTADOS

- 1-Pico alcalino/fondo ácido (pico rojo/fondo amarillo): fermenta la glucosa.
- 2-Pico ácido/fondo ácido (pico amarillo/fondo amarillo): fermenta glucosa, y lactosa.
- 3-Pico alcalino/fondo alcalino (pico rojo/fondo rojo): no fermentador de azúcares.
- 4-La presencia de burbujas, o ruptura del medio de cultivo: gas.
- 5-El ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico.

ANEXO 11 FLUJOGRAMA DE IDENTIFICACION DE ENTEROBACTERIAS



ANEXO 12

INFUSION CEREBRO CORAZON (BHI)

FUNDAMENTO

Es un medio muy rico en nutrientes, que proporciona un adecuado desarrollo microbiano. La infusión de cerebro de ternera, la infusión de corazón vacuno y la peptona, son la fuente de carbono, nitrógeno, y vitaminas. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el fosfato disódico otorga capacidad buffer. Los nutrientes de este caldo son muy apropiados para los hemocultivos, ya que en esta infusión desarrollan todas las especies de estreptococos excepto los tiol y piridoxal dependientes.

Los estafilococos que crecen en esta infusión suelen dar mejores reacciones en la prueba de la coagulasa.

COMPONENTES

Fórmula (en gramos por litro)	
Infusión de cerebro de ternera	200.0
Infusión corazón vacuno	250.0
Peptona	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Glucosa	2.0
Fosfato disódico	2.5
pH final: 7.4 ± 0.2	

PREPARACION

Suspender 37 g del polvo en un litro de agua destilada. Calentar a ebullición hasta disolver completamente. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Los tubos que no se usen inmediatamente deberán calentarse en un baño hirviendo para la eliminación del oxígeno retenido. Enfriar rápidamente sin agitar.

ANEXO 13 PRUEBA DEL INDOL

FUNDAMENTO

La prueba de indol está basada en la formación de un complejo rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehído del p-dimetilaminobenzaldehído. Este es el principio activo del reactivo de Kovacs descrito más adelante. El medio de cultivo utilizado debe ser rico en triptófano

MEDIOS Y REACTIVOS

CALDO TRIPTOFANO	
Peptona	2 g.
Cloruro de Sodio	0.5 g
Agua Destilada	100 ml
REACTIVO DE KOVACS	
Alcohol Amílico	150 ml
Dimetil Benzaldehido	10 g
Acido Clorhídrico c.c.	50 ml

PROCEDIMIENTO

Inocular el caldo triptófano con la bacteria en estudio e incubar a 35°C durante 18 a 24 horas. Al finalizar este período, añadir 5 gotas de reactivo por la pared interior del tubo.

INTERPRETACIÓN

El desarrollo de un color rojo intenso en la interfase del reactivo y el caldo, segundos después de añadir el reactivo indica la presencia de indol y un resultado de la prueba positiva.

ANEXO 14 CITRATO DE SIMMONS

FUNDAMENTO

En el medio de cultivo, el fosfato monoamónico es la única fuente de nitrógeno y el citrato de sodio es la única fuente de carbono. Ambos componentes son necesarios para el desarrollo bacteriano. Las sales de fosfato forman un sistema buffer, el magnesio es cofactor enzimático. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, y el azul de bromotimol es el indicador de pH, que vira al color azul en medio alcalino. El medio de cultivo es diferencial en base a que los microorganismos capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono, usan sales de amonio como única fuente de nitrógeno, con la consiguiente producción de alcalinidad. El metabolismo del citrato se realiza, en aquellas bacterias poseedoras de citrato permeasa, a través del ciclo del ácido tricarboxílico. El desdoblamiento del citrato da progresivamente, oxalacetato y piruvato. Este último, en presencia de un medio alcalino, da origen a ácidos orgánicos que, al ser utilizados como fuente de carbono, producen carbonatos y bicarbonatos alcalinos. El medio entonces vira al azul y esto es indicativo de la producción de citrato permeasa.

COMPONENTES

Fórmula (en gramos por litro)	
Citrato de sodio	2.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato dipotásico	1.0
Fosfato monoamónico	1.0
Sulfato de magnesio	0.2
Azul de bromotimol	0.08
Agar	15.0

pH final: 6.9 ± 0.2

PROCEDIMIENTO

Suspender 24,2 g del medio deshidratado por litro de agua destilada. Dejar reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 o 2 minutos. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar en posición inclinada.

ANEXO 15 GALERIA API 20E

FUNDAMENTO

Las tiras API 20E de sistema rápido de identificación combina algunos tests convencionales y permite la identificación de un número limitado de Enterobacteriaceae. La prueba consiste en 20 pequeños tubos o pocillos con reactivos, los cuales incluyen el sustrato. Una identificación es solo posible con un cultivo microbiológico. Para garantizar la comparabilidad de diferentes muestras hay que seguir las instrucciones del fabricante.

Antes de empezar el test, hay que estar seguro, de que el cultivo es de Enterobacteriaceae o no. Para hacer la prueba, es necesaria una prueba rápida de citocromo c oxidasa es obligatoria. Ya que, las NO Enterobacteriaceae son citocromo c oxidasa positivas y las SI Enterobacteriaceae son negativas.

Este sistema de clasificación fue desarrollado para la rápida clasificación clínica de las bacterias más relevantes, por ellos solo las bacterias conocidas pueden ser identificadas.

Las pruebas de que consta la galería API 20 E son las siguientes:

Prueba	Reacción / Enzimas
ONPG	Beta-galactosidasa
ADH	Arginina deshidrolasa
LDC	Lisina descarboxilasa
ODC	Ornitina descarboxilasa
CIT	Utilización del citrato

H2S	Producción de H ₂ S
URE	Ureasa
TDA	Triptófano desaminasa
IND	Producción de indol
VP	Producción de acetoina (Voges-Proskauer)
GEL	Gelatinasa
GLU	Fermentación/oxidación de glucosa
MAN	Fermentación/oxidación de manitol
INO	Fermentación/oxidación de inositol
SOR	Fermentación/oxidación de sorbitol
RHA	Fermentación/oxidación de ramnosa
SAC	Fermentación/oxidación de sacarosa
MEL	Fermentación/oxidación de melobiosa
AMY	Fermentación/oxidación de amigdalina
ARA	Fermentación/oxidación de arabinosa
OX	Citocromo oxidasa

Procedimiento

1. A partir de una colonia aislada del microorganismo, hacer una suspensión en 5 mL de solución salina (1% de NaCl) o 5 ml de agua estéril.
2. Llenar con la suspensión de bacterias los tubos de todos los pocillos.
3. Cubrir con parafina las cúpulas de los pocillos ADH, LDC, ODC, URE, H2S para obtener anaerobiosis.
4. Poner la tira en su propia cámara húmeda de incubación.
5. Incubara 37°C durante 18-24 h.





ANEXO 16

BILIS ESCULINA AGAR

FUNDAMENTO

Los estreptococos del grupo D crecen rápidamente en el agar bilis esculina e hidrolizan la esculina, que en presencia de iones hierro forman un compuesto de color verde oliva hasta negro. Las sales biliares presentes inhiben el desarrollo de la flora acompañante.

COMPONENTE

Fórmula (en gramos por litro)	
Extracto de carne	3.0
Peptona de carne	5.0
Bilis de buey	40.0
Esculina	1.0
Citrato férrico	0.5
Agar	15.0
pH final: 6.6 ± 0.2	

PROCEDIMIENTO

Suspender 64,5 g en un litro de agua destilada. Dejar reposar 5 minutos.

Calentar a ebullición hasta su completa disolución.

Distribuir en tubos o frascos y esterilizar 15 minutos a 121°C.

ANEXO 17

AGAR MC CONKEY

FUNDAMENTO

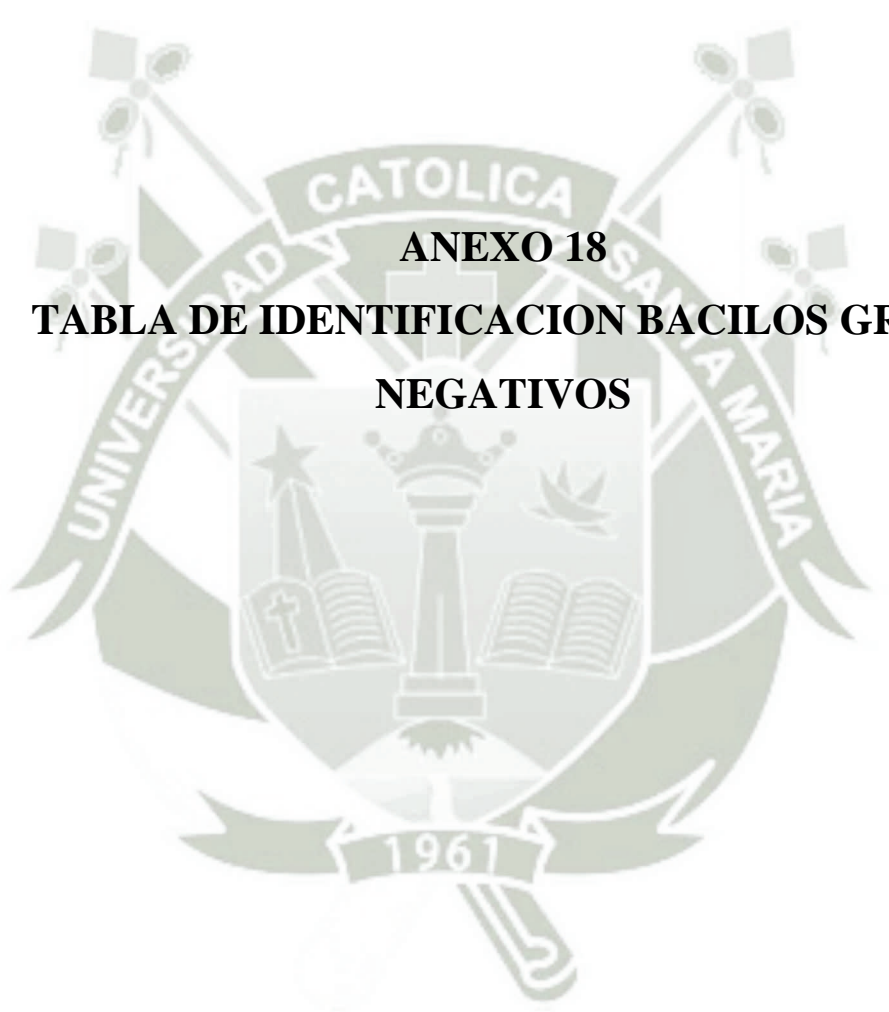
En el medio de cultivo, las peptonas, aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, y la mezcla de sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de gran parte de la flora Gram positiva. Por fermentación de la lactosa, disminuye el pH alrededor de la colonia. Esto produce un viraje del color del indicador de pH (rojo neutro), la absorción en las colonias, y la precipitación de las sales biliares. Los microorganismos no fermentadores de lactosa producen colonias incoloras.

COMPONENTES

Fórmula (en gramos por litro)	
Peptona	17.0
Pluripeptona	3.0
Lactosa	10.0
Mezcla de sales biliares	1.5
Cloruro de sodio	5.0
Agar	13.5
Rojo neutro	0.03
Cristal violeta	0.001
pH final: 7.1 ± 0.2	

PROCEDIMIENTO

Suspender 50 g del polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar hasta uniformar. Calentar suavemente y hervir 1 a 2 minutos hasta disolver. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.



ANEXO 18

TABLA DE IDENTIFICACION BACILOS GRAM NEGATIVOS

POSITIVOS

CG(4)

表27 嫌気性球菌の種の鑑別性状

Species	Intestine (human) Clinical (human)	Cell morphology on agar plate	Gram stain Growth in PY Glucose Arabinose	Gas Nitrate Indole Gelatin	Main products from PYFC	Arabinose Xylose Ribose Sorbitol Glucose Mannose Fructose Galactose	Sucrose Maltose Cellulose Lactose Trehalose Melibiose	Raffinose Melezitose	Starch pH Glucogen Inulin	Glycerol Sorbitol Erythritol Inositol Adonitol	Esculin pH Salicin Amygdalin	Starch hyd Esculin hyd.
<i>Sarcina ventriculi</i>	+	+	+++	+	A	+	+	+	+	+	+	+
<i>Megasphaera elsdenii</i>	++	+	+++	+	CB	+	+	+	+	+	+	+
<i>Veillonella parvula</i>	++	+	+++	+	ap	+	+	+	+	+	+	+
<i>Acidaminococcus fermentans</i>	++	+	+++	+	Ab	+	+	+	+	+	+	+
<i>Gemmiger formicilis</i>	+	+	V	+	FB	V	+	+	+	+	+	+
<i>Pc. productus</i>	++	+	+++	+	As	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. intermedius</i>	+	+	+++	+	L	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. constellatus</i>	++	+	+++	+	Lafs	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pc. parvulus</i>	++	+	+++	+	La	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. marbillorum</i>	++	+	+++	+	Laf	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pc. saccharolyticus</i>	+	+	+++	+	FA2	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pc. anaerobius</i>	+	+	+++	+	A	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pc. prevotii</i>	++	+	+++	+	Ab	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pc. micros</i>	++	+	+++	+	A	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pc. indolicus</i>	+	+	+++	+	ABp	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pc. anaerolyticus</i>	++	+	+++	+	Ab	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pc. niger</i>	++	+	+++	+	CB	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pc. magnus</i>	++	+	+++	+	A	+	+	+	+	+	+	+
<i>R. oborum</i>	+	+	+++	+	A2	+	+	+	+	+	+	+
<i>R. gnarus</i>	+	+	+++	+	FA12	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. comes</i>	+	+	+++	+	Lba	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. exsuctus</i>	+	+	+++	+	Fbla	+	+	+	+	+	+	+
<i>R. callidus</i>	+	+	+++	+	SA	+	+	+	+	+	+	+
<i>R. albus</i>	+	+	+++	+	A2	+	+	+	+	+	+	+
<i>R. lactaris</i>	+	+	+++	+	FLAs	+	+	+	+	+	+	+
<i>R. longus</i>	+	+	+++	+	La2	+	+	+	+	+	+	+
<i>R. bromii</i>	+	+	+++	+	a2	+	+	+	+	+	+	+
<i>R. flavofaciens</i>	+	+	+++	+	ASF	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. catus</i>	+	+	+++	+	BPa	+	+	+	+	+	+	+

Fuente: Dubroi

ANEXO 22

TABLA DE IDENTIFICACION BACILOS GRAM

NEGATIVOS

Species	Intestine (human) Clinical	Cell morphology on agar plate	Spore location	Motility Nitrate Indole Gelatin Lecithinase Lipase Hemolysis	Main products from PYFG	Arabinose	Xylose	Rhamnose	Sorbitol	Ribose	Glucose	Mannose	Fructose	Galactose	Sucrose	Meliose	Cellulose	Lactose	Trehalose	Melibiose	Raffinose	Melzitose	Starch pH	Glycogen	Inulin	Glycerol	Mannitol	Sorbitol	Erythritol	Inositol	Dulcitol	Esculin pH	Salicin	Amygdalin	Starch hyd.	Esculin hyd.	Note		
<i>C. tertium</i>	++	12	T	+	ALB	-	V	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	W	-	W	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+		
<i>C. durum</i>	..	16	ST	+	β	LFA2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. camis</i>	..	14	ST	+	β	BAf	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. inulinum</i>	..	77	ST	+	-	La	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. perenne</i>	..	11	T	+	-	BA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. barati</i>	..	61	ST	+	-	BLa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. sphenoides</i>	++	133	ST	+	+	A2	-	V	W	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. clostridioforme</i>	++	13	ST	+	-	Af	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. symbiosum</i>	++	11	ST	V	-	BA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. indolis</i>	++	111	T	+	+	AF2	W	W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. malenominatum</i>	++	100	T	+	+	BA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. oroticum</i>	++	10	S	+	-	FA12	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>C. coccoides</i>	..	78	S	-	-	Sa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>C. nezile</i>	..	11	S	-	-	AF2	-	W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. cellobiosum</i>	..	11	T	+	-	ALs	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. sartagoformis</i>	++	101	T	+	-	BAF1	-	V	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. acetobutyricum</i>	..	13	ST	+	-	BA4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. butyricum</i>	++	12	ST	+	-	BAF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. beijerinckii</i>	++	101	ST	+	-	BA	W	+	V	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. pseudoteticum</i>	++	100	T	+	-	BAF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. thermanocarolyticum</i>	..	11	T	-	-	ALB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. pompatrificum</i>	++	11	T	+	-	LBA	-	-	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. celatum</i>	..	100	ST	+	-	FAb	-	-	-	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. rectum</i>	..	10	ST	+	-	FAL	-	-	-	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
<i>C. innocuum</i>	++	10	T	-	-	LBA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. ramosum</i>	++	101	T	+	-	FAL	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. coelestium</i>	..	103	TST	-	-	L	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. spiroforme</i>	..	100	TST	-	-	L	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. fallax</i>	++	101	ST	+	-	AB	-	-	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. barkei</i>	..	100	T	-	-	BL	-	-	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. leptum</i>	..	101	ST	-	-	A	-	W	-	W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. aminovalericum</i>	++	103	T	+	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. pasteurianum</i>	..	10	ST	-	-	BA	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. glycolicum</i>	++	10	ST	+	-	Ai/Vib	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. scatologenes</i>	..	10	T	+	-	ABCiv vpb	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. tyrobutyricum</i>	..	10	ST	V	-	BAa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. sticklandii</i>	..	10	ST	+	+	AB/Vib lps 4	-	-	W	W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. cochlearium</i>	++	10	ST	+	-	BAp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. sporophacoides</i>	..	10	T	-	-	Alp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>C. putrefaciens</i>	..	10	ST	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	