



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al Título de

DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

**“DESARROLLO DE UN MODELO EXPERIMENTAL PARA EL
ESTUDIO IN VIVO DE LA FARMACODINAMIA DE LOS
ANTIMICROBIANOS”**

AUTOR: *MENESES, María Laura.*

DIRECTOR: *LANDONI, María Fabiana.*

LUGAR DE TRABAJO: Laboratorio de Farmacología General. Facultad de
Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

MIEMBROS DEL JURADO

Dra. Cecilia Carbone

Dr. Roberto Rule

Dr. Carlos Lanusse

Año 2013

Dedicada a mis hijos, Ampí y Bauti.

A mis viejos, Carlos y Cristela.

A mi marido, Diego.

Mis más sinceros agradecimientos:

A mi directora, PhD Dra. María Fabiana Landoni por su generosidad en la transmisión del conocimiento científico, demostrando una gran vocación de enseñanza y permitiéndome trabajar con libertad de acción. Por acompañar y comprender desde lo laboral mis cambios personales, respetando mi maternidad.

A mis compañeros de laboratorio, Dr. Marcos Ferrante, Méd. Vet. Nicolás Galinelli, Dra. Marta Lara, Méd. Vet. Paula Lorena Martin, Méd. Vet. Pilar Gabrilco por la colaboración desinteresada en los ensayos in vivo, sacrificando su tiempo libre.

A la Bact. Mónica Alt por guiarme en los inicios de la tesis con las buenas prácticas de laboratorio, actividad esencial para obtener resultados certeros.

A la Dra. Gabriela Albarellos por sus aportes científicos.

A mis viejos por inculcarme su responsabilidad y capacidad de trabajo. Por bancar de múltiples maneras este trabajo de tesis y por darme una infancia feliz y libre de preocupaciones.

A mi marido, por incentivar a pesar de las adversidades personales a que finalice mi trabajo de tesis. Por bancarme con los nenes para realizar los ensayos, por entender el tiempo que hay que sacrificar con la familia y por su amor incondicional.

A mis hermanos, mi prima y mis amigas por ayudarme siempre que lo necesité.

A todos los que colaboraron en menor medida con este trabajo, siendo su aporte también fundamental para cerrar esta tesis.

PRESENTACIONES A CONGRESOS SURGIDAS DE LA PRESENTE TESIS

Meneses, M.L.; Alt, M.; Albarellos, G.; Landoni, M.F. Propuesta de un modelo in vivo para estudios PK/PD de antibióticos en animales domésticos. XVIII Jornadas Nacionales y XIII Jornadas Latinoamericanas de Farmaco-Toxicología Veterinaria. UBA. Ciudad de Buenos Aires. 5-6 de Septiembre de 2008.

Meneses, M.L; Albarellos, G ; Landoni, MF.Comparación de la eficacia antibacteriana de dos diseños de dosificación de cefalexina en conejos. XIX Jornadas Argentinas y XIV Jornadas Latinoamericanas de Fármaco-Toxicología Veterinaria. 3 de Septiembre de 2009. Universidad Católica de Córdoba.

Meneses, M.L; Albarellos, G ; Landoni, MF. Development of an in vivo model for antimicrobial PK/PD studies in domestic animals. Fifth Internacional Conference on Antimicrobial Agents in Veterinary Medicine (AAVM 2010). 11-15 de Mayo de 2010. Tel- Aviv, Israel.

Meneses, M.L; Albarellos, G ; Landoni, MF.Clinical efficacy of two administration designs of cephalaxina in rabbits . Fifth Internacional Conference on Antimicrobial Agents in Veterinary Medicine (AAVM 2010). 11-15 de Mayo de 2010. Tel- Aviv, Israel.

PUBLICACIONES SURGIDAS DE LA PRESENTE TESIS

Meneses, M.L.; Albarelllos, G.A.; Landoni, M.F. (2012) Development and validation of an in vivo model for PK/PD studies of antimicrobials in domestic animals. Veterinary Science Development 10-2:45-49.

Meneses, M.L.; Landoni, M.F. (2012) Biofilms bacterianos. Analecta Veterinaria 32(1) 44-49.

Meneses, M.L.; Albarelllos, G.; Landoni, M.F. (2013) Pharmacokinetics of cephalexin after intravenous and single and multiple intramuscular administration to rabbit. International Journal of Veterinary Medicine: Research & Reports (en prensa)

INDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|----|
| TÍTULO, RESUMEN Y PALABRAS CLAVE | 1 |
| TITLE, KEYWORDS AND SUMMARY | 3 |
| I – INTRODUCCIÓN | 5 |
| ¿Qué es una infección? | 6 |
| Evaluación de la eficacia antimicrobiana en la actualidad | 8 |
| Fortalezas y debilidades de la CIM como parámetro farmacodinámico | 17 |
| Concentraciones de fármacos de interés en el análisis farmacocinético | 20 |
| Modelos experimentales para estudios PK/PD | 22 |
| II.- MATERIALES Y MÉTODOS | 29 |
| Lugar de trabajo | 31 |
| Materiales | 32 |
| Métodos | 37 |
| Etapa 1 | |
| 1.1) Estudio de inocuidad del DIS | 37 |
| 1.2) Estudio comparativo del crecimiento bacteriano en el interior de dispositivos implantados subcutáneamente en conejos e incubados en estufa de cultivo a 37°C | 39 |
| Etapa 2 | |
| Puesta a punto de los métodos analíticos | 41 |
| 2.1) Puesta a punto del método microbiológico para cefalexina | 42 |
| 2.2) Puesta a punto del método microbiológico para ciprofloxacina | 46 |

Etapa 3

- 3.1) Descripción de la disposición plasmática de cefalexina tras su administración intravenosa a dosis única de 10 mg/kg 47
- 3.2) Descripción de la disposición plasmática de cefalexina tras su administración intravenosa a dosis de 2.5 mg/kg/6h durante un período de 24 horas 49
- 3.3) Descripción de la disposición plasmática de cefalexina tras su administración intramuscular a dosis única de 10 mg/kg. 50
- 3.4) Descripción de la disposición plasmática de cefalexina tras su administración intramuscular a dosis de 2.5 mg/kg/6h durante un período de 24 horas 50

Etapa 4

- 4.1) Descripción de la disposición plasmática de ciprofloxacina tras su administración intravenosa a dosis única de 30 mg/kg. 51
- 4.2) Descripción de la disposición plasmática de ciprofloxacina tras su administración intravenosa a dosis de 7.5 mg/kg/6h durante un período de 24 horas 52
- 4.3) Descripción de la disposición plasmática de ciprofloxacina tras su administración intramuscular a dosis única de 30 mg/kg. 53
- 4.4) Descripción de la disposición plasmática de ciprofloxacina tras su administración intramuscular a dosis de 7.5 mg/kg/6h durante un período de 24 horas 54
- 5) Integración cinético/dinámica a los datos obtenidos en los estudios realizados con cefalexina y ciprofloxacina e identificación de la correlación entre los diferentes parámetros farmacocinéticos y las curvas de muerte bacteriana. 54

Análisis farmacocinético:

Discriminación del modelo farmacocinético 55

| | |
|--|----|
| <i>Cálculo de los parámetros farmacocinéticas</i> | 56 |
| III – RESULTADOS | 59 |
| Etapa 1 | |
| 1.1) Estudio de inocuidad del DIS | 59 |
| 1.2) Estudio comparativo del crecimiento bacteriano en el interior de dispositivos implantados subcutáneamente en conejos e incubados en estufa de cultivo a 37°C | 60 |
| Etapa 2 | |
| Puesta a punto de los métodos analíticos | |
| 2.1) Puesta a punto del método microbiológico para cefalexina | 62 |
| 2.2) Puesta a punto del método microbiológico para ciprofloxacina | 66 |
| Etapa 3 | |
| 3.1) Estudio de las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente, disposición plasmática y análisis cinético de cefalexina tras su administración intravenosa a dosis única de 10 mg/kg | 70 |
| 3.2) Estudio de las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente, disposición plasmática y análisis cinético de cefalexina tras su administración intravenosa a la dosis de 2.5 mg/kg/6h durante un período de 24 horas | 75 |
| 3.3) Estudio de las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente, disposición plasmática y análisis cinético de cefalexina tras su administración intramuscular a dosis única de 10 mg/kg | 80 |
| 3.4) Estudio de las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente, disposición plasmática | 85 |

y análisis cinético de cefalexina tras su administración intramuscular a la dosis de 2.5 mg/kg/6h durante un período de 24 horas

Etapa 4

- | | |
|---|-----|
| 4.1) Estudio de las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente, disposición plasmática y análisis cinético de ciprofloxacina tras su administración intravenosa a dosis única de 30 mg/kg | 90 |
| 4.2) Estudio de las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente, disposición plasmática y análisis cinético de ciprofloxacina tras su administración intravenosa a la dosis 7.5 mg/kg/6h durante un período de 24 horas | 95 |
| 4.3) Estudio de las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente, disposición plasmática y análisis cinético de ciprofloxacina tras su administración intramuscular a dosis única de 30 mg/kg | 100 |
| 4.4) Estudio de las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente, disposición plasmática y análisis cinético de ciprofloxacina tras su administración intramuscular a la dosis 7.5 mg/kg/6h durante un período de 24 horas | 105 |

IV - DISCUSION Y CONCLUSIONES

1.- DISCUSION Y CONCLUSIONES PARCIALES ETAPAS 1 y 2:

- | | |
|---|-----|
| 1.1. <i>Diseño y evaluación de la inocuidad y aplicabilidad de un dispositivo de implantación subcutánea (DIS) que permita el análisis in vivo del crecimiento bacteriano</i> | 111 |
|---|-----|

- | | |
|---|-----|
| 1.2 <i>Puesta a punto de métodos analíticos</i> | 112 |
|---|-----|

2.- DISCUSION Y CONCLUSIONES PARCIALES ETAPA 3:

| | |
|---|-----|
| 2.1.- Estudio de las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente, disposición plasmática y análisis cinético de cefalexina tras su administración intravenosa a dosis única de 10 mg/kg. | 113 |
| 2.2.- Estudio de las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente, disposición plasmática y análisis cinético de cefalexina tras su administración intravenosa a la dosis de 2.5 mg/kg/6h durante un período de 24 horas | 117 |
| 2.3.- Estudio de las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente, disposición plasmática y análisis cinético de cefalexina tras su administración intramuscular a dosis única de 10 mg/kg. | 119 |
| 2.4.- Estudio de las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente, disposición plasmática y análisis cinético de cefalexina tras su administración intramuscular a la dosis de 2.5 mg/kg/6h durante un período de 24 horas | 121 |
| CONCLUSIONES GENERALES ETAPA 3 | 122 |
| 3.- DISCUSION Y CONCLUSIONES PARCIALES ETAPA 4: | |
| 3.1.- Estudio de las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente, disposición plasmática y análisis cinético de ciprofloxacina tras su administración intravenosa a dosis única de 30 mg/kg | 124 |
| 3.2.- Estudio de las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente, disposición plasmática y análisis cinético de ciprofloxacina tras su administración intravenosa a la dosis 7.5 mg/kg/6h durante un período de 24 horas | 126 |
| 3.3.- Estudio de las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los | 127 |

dispositivos implantados subcutáneamente, disposición plasmática y análisis cinético de ciprofloxacina tras su administración intramuscular a dosis única de 30 mg/kg

| | |
|--|-----|
| 3.4.- Estudio de las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente, disposición plasmática y análisis cinético de ciprofloxacina tras su administración intramuscular a la dosis 7.5 mg/kg/6h durante un período de 24 horas | 128 |
| CONCLUSIONES GENERALES ETAPA 4 | 129 |
| DISCUSION Y CONCLUSIONES GENERALES | 130 |
| V – BIBLIOGRAFÍA | 143 |

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

CIM: concentración inhibitoria mínima

UFC: unidades formadoras de colonia

DL50: dosis letal cincuenta

CBM: concentración bactericida mínima

PK/PD: farmacocinética/farmacodinámica

EPA: efecto post-antibiótico

Log: logaritmo

$AUC_{(0-\infty)}$: área bajo la curva concentración plasmática vs tiempo en infinito

$AUC_{(0-24)}$: área bajo la curva concentración plasmática vs tiempo en 24 h.

C_{max} : concentración máxima observada

T: tiempo

$AUC_{(0-24)}/CIM$: area bajo la curva/ concentración inhibitoria mínima

C_{max}/CIM : concentración máxima/ concentración inhibitoria mínima

$T > CIM$: tiempo por encima de la concentración inhibitoria mínima

CIM50: concentración inhibitoria mínima para el 50% de la muestra

CIM90: concentración inhibitoria mínima para el 90% de la muestra

CIM100: concentración inhibitoria mínima para el 100% de la muestra

$\mu\text{g/ml}$: microgramos/ mililitro

EPC: efecto post-CIM

AUIC: área bajo la curva de concentración inhibitoria

TCF: dispositivos de fluido tisular (tissue cage fluid)

μm : micrómetro

DIS: dispositivo de implantación subcutánea

ATCC: American Type Culture Collection

DE: desvío estándar

LOQ: límite de cuantificación

LD: límite de detección

r^2 : coeficiente de correlación

CV: coeficiente de variación

G: Gauge

AIC: Akaike Information Criterion

MAICE: Minimum Akaike Information Criterion Estimation

N: número de observaciones

Ln: logaritmo natural

Re: suma del cuadrado de las residuales entre concentraciones experimentales y estimadas

P: número de parámetros

Σ : sumatoria

Wi: factor de ponderación de cada observación

Cest: concentración estimada

Cobs: concentración observada

C(t): concentración plasmática a tiempo t

Yi: coeficiente al término i^n

$-\lambda_i$: (1/h) exponente.

Y : concentración extrapolada a tiempo 0

$-\lambda$: pendiente de la fase de eliminación ($1/\lambda$).

Tlag: tiempo lag

FD: dosis corregida por la biodisponibilidad

V_d : volumen de distribución

λ_1 y λ_2 : constantes de primer orden de las fases inicial (absorción) y terminal (eliminación)

C_p : concentración plasmática

K_a : constante de tasa de absorción

K_e : constante de tasa de eliminación

$t_{1/2}$ abs : vidas medias de absorción

$t_{1/2}$ el: vidas medias de eliminación

MRT: tiempo medio de residencia (mean residence time)

C_{last} : última concentración medida

CIB: clearance corporal

F: biodisponibilidad

$V_{d(ss)}$: volumen de distribución en estado estacionario

$\mu\text{g/ml}$: microgramos/milimetro

mg/kg : miligramo/kilogramo

ufc/ml : unidades formadoras de colonia/milimetro

ES: error estándar

C_o : concentración máxima estimada

Cl: clearance

AUMC: área bajo la curva de primer momento (area under the first moment curve)

Tmax: tiempo al cual se observa la concentración máxima

T1/2: vida media

Volume/F: volumen de distribución/biodisponibilidad

HPLC: cromatografía líquida de alta presión (High-performance liquid chromatography)

pH: potencial hidrógeno

AC/V: área capilar/volumen

DESARROLLO DE UN MODELO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO IN VIVO DE LA FARMACODINÁMICA DE LOS ANTIMICROBIANOS

Palabras claves: antimicrobianos – cefalexina – ciprofloxacina –farmacodinamia - farmacocinética - PK/PD

Resumen:

En la actualidad, la CIM asume un papel fundamental en el cálculo de los parámetros farmacocinéticos/farmacodinámicos, $T > CIM$; AUC/CIM y C_{max}/CIM , considerados como predictores de la eficacia antimicrobiana. Sin embargo, la importancia de la CIM como parámetro de la eficacia in vivo de un antimicrobiano es controversial. Las condiciones estandarizadas de la prueba (tamaño de inóculo definido, medios artificiales y concentraciones estáticas) son realmente diferentes de las esperadas en el sitio de infección. Dichas controversias han obligado a los investigadores a diseñar modelos experimentales *in vivo*. Sin embargo los modelos diseñados hasta el momento no poseen enfoques adecuados para una correcta evaluación de lo que ocurre durante el tratamiento antimicrobiano de un proceso infeccioso, limitándose a conclusiones de eventos particulares y estáticos.

Basado en lo expuesto, en la actualidad se carece de un modelo in vivo aceptable que permita estudiar de forma integrada la farmacocinética y farmacodinamia de los antimicrobianos, que produzca información de calidad científica y al mismo tiempo respete el bienestar de los animales experimentales.

En la presente tesis se propuso el desarrollo y la validación de un modelo de estudio *in vivo* completamente novedoso, que podría subsanar las debilidades encontradas en los modelos anteriores.

Para cumplir este objetivo, se diseñó un dispositivo de implantación subcutánea (DIS) que permitió el estudio *in vivo* del crecimiento bacteriano y su modificación por la aplicación de diferentes estrategias terapéuticas. El modelo permitió la integración PK/PD y la identificación de correlaciones entre los diferentes parámetros farmacocinéticos y las curvas de muerte bacteriana. En resumen, el modelo experimental presentado en el presente trabajo de tesis resultaría adaptable para el estudio de la mayoría de los componentes del proceso infeccioso, como ser formación de biofilm, persistencia bacteriana, efecto inóculo, etc. A su vez es un modelo que ofrece la posibilidad de trabajar con animales sanos sin producir septicemia y respetando el bienestar de los mismos.

**DEVELOPMENT OF AN EXPERIMENTAL MODEL FOR IN VIVO STUDY OF
ANTIMICROBIALS PHARMACODYNAMICS.**

Keywords: antimicrobial – cephalexin - ciprofloxacin – pharmacodynamic – pharmacokinetic – PK/PD.

Summary:

Nowadays, MIC is considered fundamental for pharmacokinetic/ pharmacodynamic parameter calculation, $T > CIM$; AUC/CIM y C_{max}/CIM , consider as efficacy predictors. However, the importance of MIC as an *in vitro* efficacy parameter for antimicrobials is controversial. Standardized conditions on MIC test (inoculum size, artificial culture mediums and static concentrations) are really different to that expected at the site of infection. Mentioned controversies have forced researches to develop *in vivo* experimental models. However, models designed so far lack of appropriate focus for a proper evaluation of the scenario during an antimicrobial treatment of an infectious process; conclusions, then, are limited to particular and static events.

Based on the previously presented information, there is not an acceptable *in vivo* model allowing the integrated study of antimicrobials pharmacokinetics and pharmacodynamics, which would produce high quality scientific information, and at the same time, sustain animal welfare.

In the present Thesis, for covering the weaknesses of older models, the development and validation of a novel and original *in vivo* model was proposed.

For achieving this goal, a device for subcutaneous implantation was designed and validated. This device allowed the *in vivo* study of bacterial growing together with its modification by different therapeutic interventions.

The model allowed PK/PD integration and identification of correlation between PK parameters and bacterial death curves. In summary, the experimental model presented in this thesis is flexible and can be adapted for studying most of the components of the infectious process, such as, biofilm formation, bacterial persistence, inoculum-effect, etc. Also, the model allows to work with healthy experimental animals, avoiding septicaemia induction and then, sustaining welfare.

I.- INTRODUCCIÓN

En los últimos 70 años el desarrollo de los agentes antimicrobianos ha sido verdaderamente exitoso; sin embargo el uso clínico óptimo de estos agentes sigue siendo limitado debido al escaso conocimiento referente a los principios subyacentes en las interacciones *in vivo* entre los agentes antimicrobianos, los agentes patógenos y los organismos huésped (Craig,1998 ; Jacobs, 2001; Andes y col. 2004).

Esta situación, afortunadamente, se ha modificado en los últimos años con la aparición de estudios dirigidos a aclarar las interacciones antimicrobiano : bacteria : huésped (Jacobs, 2001; Craig, 2003). Este tipo de estudios, enfocados actualmente al desarrollo de nuevos agentes, también permiten la modificación y mejora de regímenes de dosificación de fármacos existentes desarrollando lineamientos de tratamiento racional con el objetivo de superar la resistencia de los patógenos (Dagan, 2003) y minimizar la toxicidad de las drogas (Rybak y col. 1999; Turnidge, 2003; Anon y col. 2004; American Academy of Pediatrics and American Academy of Family Physicians, 2004). Dichas mejoras han sido alcanzadas, en gran parte, gracias a la utilización de modelos de estudio *in vitro*. Sin embargo las conclusiones extraídas de estos estudios no representan con exactitud la situación real de un proceso infeccioso en el organismo. Por su parte, los modelos *in vivo* utilizados hasta el momento no poseen enfoques adecuados de lo que ocurre en el tratamiento antimicrobiano de un proceso infeccioso, limitándose a conclusiones de eventos particulares que corren el foco de atención de lo que sería el tratamiento general de la infección.

Aún no se han encontrado modelos animales efectivos que no alteren drásticamente la salud del animal y con ello los valores arrojados por dichos estudios. La presente tesis propone un modelo de estudio in vivo completamente novedoso, que podría subsanar las falencias encontradas en los modelos en uso a la fecha.

¿Qué es una infección?

Con el objetivo de encausar correctamente esa introducción, recordemos que “infección” es un término clínico que indica contaminación.

Sin embargo, debe advertirse que la sola presencia de un microorganismo patógeno sobre o dentro de un organismo animal, no significa enfermedad. Para que exista enfermedad debe haber colonización, multiplicación e invasión y además, manifestaciones clínicamente reconocibles de alteración orgánica (síntomas) y manifestaciones de respuesta inmunológica o por lo menos una de estas dos últimas.

Una enfermedad infecciosa está gobernada por factores propios del microorganismo invasor, como ser su “virulencia” lo que indica el grado de patogenicidad y la “carga infecciosa” referido a la cantidad de partículas infectantes o virulentas que invaden al organismo (Lüchter, 2003)

Por lo tanto, cuando elegimos un tratamiento antimicrobiano deberíamos tener en cuenta cada uno de estos parámetros; sin embargo, lo que sucede en la actualidad es que los tratamientos son elegidos indistintamente para cualquier tipo de infección, basándose la elección, fundamentalmente, en la sensibilidad del o los

microorganismos involucrados según su valor CIM (concentración inhibitoria mínima).

Recordemos, que el valor de CIM es obtenido in vitro, bajo condiciones estandarizadas y con un inóculo constante. Por lo tanto, no incluye en su determinación ninguna característica propia de la situación real, excepto el patógeno involucrado. Para graficar esta situación consideremos que en una infección bacteriana:

1.- Dependiendo del estado inmunológico del paciente y de la capacidad infectiva del microorganismo, se pueden encontrar dos poblaciones microbianas en los sitios de infección: las formas planctónicas (cuya sensibilidad es reflejada por la CIM) y las formas de biofilm (cuya sensibilidad es completamente ignorada por la CIM)

2.- La infección no está homogéneamente distribuida; pueden encontrarse grandes inóculos bacterianos en una parte del foco y bajos en otra. Esto tampoco está contemplado en el valor de CIM.

Por lo tanto, es importante remarcar que una invasión bacteriana es un proceso dinámico sujeto a diferentes factores, los cuales deberían ser tenidos en cuenta si se pretende identificar el tratamiento antimicrobiano óptimo para la infección.

Existen también factores que hacen al éxito y/o al fracaso de los tratamientos antimicrobianos que surgen de la variabilidad inter e intra-especie. La concentración de proteínas plasmáticas es un factor muy importante ya que es la determinante de la concentración de droga libre (fracción activa) en el sitio de la infección. Otro factor

a considerar es el sitio de la infección, por ejemplo los sitios que poseen mayor área capilar (piel, músculo, parénquima pulmonar) van a tener mejor llegada del antimicrobiano que aquellos sitios con menor área capilar (hueso).

Por lo tanto, se debe recordar que la selección de los antimicrobianos no debe basarse exclusivamente en la interacción antimicrobiano: agente etiológico, sino que debe incluir las particularidades del paciente a ser tratado.

Evaluación de la eficacia antimicrobiana en la actualidad:

El efecto de un tratamiento antimicrobiano es el resultado de una dinámica de tres vías de interacción entre el huésped, la droga y el organismo infeccioso.

La farmacocinética describe la absorción, distribución, metabolismo y excreción de los fármacos en/desde el organismo, mientras que la farmacodinamia estudia la relación entre determinados patógenos y el agente antimicrobiano, considerando los efectos de las variaciones en las concentraciones de los mismos sobre la dinámica de crecimiento y muerte de los microorganismos (Craig, 1998).

Farmacodinamia de los agentes antimicrobianos

Comparado con las acciones de los distintos fármacos sobre las células y tejidos de mamíferos, las de los antimicrobianos sobre los microorganismos son totalmente diferentes. Esto es producto de las diferencias estructurales y bioquímicas entre las células eucariotas y procariotas, así como, por la capacidad de los microbios para

multiplicarse rápidamente a diferencia de la mucho más lenta velocidad de mitosis de una célula eucariota.

En la terapéutica antimicrobiana el objetivo no es modular un sistema bioquímico a efectos de mejorar o suprimir algún aspecto de una función bacteriana como el caso de los fármacos cuyo blanco terapéutico es la célula eucariota (con la clara excepción de los antineoplásicos), sino más bien matar o, en su defecto, evitar la multiplicación microbiana, facilitando su eliminación a través del sistema inmune.

Como se mencionó anteriormente, las células microbianas tienen la capacidad de multiplicarse, ya sea in vivo o en un cultivo in vitro, con el consiguiente aumento del número de células. Esta división se caracteriza por ser inicialmente rápida, conocida como fase logarítmica de crecimiento, seguida, en el caso de provisión limitada de nutrientes, por una fase de división lenta (fase de meseta) y luego una fase de no división o muerte bacteriana. Por lo tanto, cuando se estudian in vivo las acciones de los antimicrobianos sobre las bacterias debe considerarse que se trata de una población diana en aumento constante. Por consiguiente, el número de receptores sobre los que actúan los antimicrobianos para matar o evitar la división se estará modificando de manera exponencial (hasta 1000 veces) y constante.

El objetivo terapéutico del uso de antimicrobianos es controlar el número de células vivas, consideradas unidades formadoras de colonias (UFC). Sin embargo, la mayoría de los parámetros farmacodinámicos calculados in vitro no distinguen entre diferentes grados de viabilidad de las células microbianas. Por lo tanto, los estudios farmacodinámicos en células microbianas en cultivo se asemejan más a los de toxicidad aguda por drogas en los mamíferos, que convencionalmente son evaluados a través de la dosis letal media (DL50). Cabe aclarar, que las dos

situaciones no son totalmente similares; en parte, porque las células bacterianas en cultivo varían en número y nivel de actividad metabólica en función del tiempo y a que el índice de interés no es la concentración de fármaco necesaria para reducir el número de células al 50%, sino la concentración necesaria para prevenir el crecimiento visible o para reducir el número de células por un porcentaje dado (generalmente 99,9%) o incluso la concentración más baja para erradicar las bacterias (AliAbadi y Lees, 2000; Lees y Shojaee Aliabadi, 2002). Así, para algunos antimicrobianos activos contra una cepa particular de bacterias de una determinada especie, la eficacia máxima será normalmente 100%, porque con altas concentraciones o dosis se morirán todas las bacterias. Para otros antimicrobianos el número de bacterias se reduce pero se alcanza un efecto de meseta, más allá del cual los aumentos adicionales en la concentración no aumentan el porcentaje de muerte bacteriana. Los antimicrobianos de la primera clase ejercen una acción dependiente de la concentración mientras que para los de la segunda la acción se considera dependiente del tiempo.

Algunos antimicrobianos matan por la co-dependencia de mecanismos (determinando el resultado tanto el tiempo como concentración) y otros inhiben el crecimiento bacteriano (bacteriostasis), de modo que el número de células no se reduce ni se incrementa (McKellar y col. 2004).

Otra diferencia entre la clásica interacción fármaco-receptor de los estudios en mamíferos o en sus tejidos y las acciones de antimicrobianos en bacterias, monitoreado cuantitativamente como muerte celular, es que el receptor en las células eucariotas, por lo general, tiene una estructura invariable. En contraste, dentro de una población bacteriana de, por ejemplo 10^8 UFC/ml habrá significativas

diferencias estructurales y genéticas con sub-poblaciones de diferente susceptibilidad al fármaco antimicrobiano.

Es importante remarcar que la susceptibilidad de las bacterias individuales no se puede determinar y que la medición de la potencia (expresada como CIM o CBM) es un reflejo de la respuesta máxima poblacional.

Finalmente, es importante recordar que en el caso de los antimicrobianos el organismo huésped puede contribuir con el efecto farmacodinámico. La contribución del organismo huésped es de cooperación y, posiblemente de sinergismo, comprendiendo los efectos antibacterianos provistos por las defensas del hospedador (suponiendo que la competencia del sistema inmune sea normal). Esto contribuye a la eficacia global de fármacos in vivo; sin embargo complica la determinación de la eficacia absoluta del fármaco en una población ya que el efecto hospedador difiere de un animal a otro. Por lo tanto, suma un nivel adicional de complejidad para la evaluación de la eficacia antimicrobiana in vivo.

Cálculo de dosis óptima y puntos de corte

Los parámetros farmacodinámicos estimados in vitro, como la concentración inhibitoria mínima (CIM) o la concentración bactericida mínima (CBM), se utilizan para definir eficacia y potencia, así como, para clasificar a los agentes patógenos como susceptibles o resistentes a los diversos agentes antimicrobianos. Esta clasificación se basa en los llamados puntos de corte, los cuales son definidos para cada agente antimicrobiano.

Los puntos de corte para el espectro de agentes antimicrobianos en uso clínico, se han fijado desde hace varias décadas y los criterios utilizados para determinarlos han variado considerablemente. Los criterios usados para determinar los puntos de corte fueron históricamente clínicos, como la resolución de los signos y síntomas de la enfermedad. Este enfoque era generalmente válido para infecciones graves y potencialmente mortales, como septicemia, endocarditis y meningitis, pero se limitaba cuando se consideraban enfermedades con altas tasas de resolución espontánea como ser muchas infecciones del tracto respiratorio (Marchant y col., 1992; Craig, 1996). Este problema se solucionó aplicando criterios bacteriológicos (Fine y col., 1997) o estratificando por gravedad las enfermedades. Ejemplos de enfermedades donde estas estrategias han sido utilizadas con éxito son: la otitis media aguda, donde se utilizaba el criterio bacteriológico y la neumonía extrahospitalaria, donde se aplicaba la estratificación por gravedad de la enfermedad (Marchant y col. 1992; Fine y col., 1997).

En ausencia de estudios clínicos adecuados, el mejor sustituto disponible es la aplicación integrada de los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos (PK / PD), y el desarrollo de puntos de corte de la CIM sobre la base de estos parámetros (Craig, 1998; Jacobs, 2001; CLSI, 2011)

La determinación de la CIM se lleva a cabo exponiendo a las bacterias a diferentes diluciones de los antimicrobianos en caldo o agar. Después de la incubación, la menor concentración que inhibe el crecimiento visible se registra como CIM (NCCLS, 1997; EUCAST, 2000).

Por lo tanto, mantener la concentración del fármaco libre en suero/plasma por encima de la CIM para todo el intervalo de dosificación se consideraba el único

factor relevante en un tratamiento eficaz; de acuerdo a esto fueron determinados muchos regímenes de dosificación y puntos de corte (Drusano y col. 1985; Neu, 1987). Estudios posteriores han demostrado que esto no es predictivo de la eficacia en todos los casos y ha dado lugar a la comprensión de que los factores tanto biológicos como farmacológicos interactúan.

Como se mencionó anteriormente, se han definido dos paradigmas básicos de la relación in vivo de la cinética y la dinámica de los antimicrobianos, la aplicación de los mismos permite diferenciar a los antimicrobianos en dos grupos. El primer grupo incluye a los antimicrobianos denominados “con cinética de muerte bacteriana concentración dependiente” para los cuales la mayor eficacia se presenta cuando las bacterias son sometidas a una alta concentración, por un período de tiempo corto. Es decir, no es necesario que las concentraciones se mantengan durante todo el intervalo interdosis por encima de la CIM debido a que presentan un importante efecto post-antibiótico (EPA). Dentro de este grupo encontramos a los aminoglucósidos y las fluoroquinolonas. (Mouton y col. 2002; McKellar y col. 2004; Toutain y col. 2002).

El segundo grupo incluye a los antimicrobianos con cinética de muerte bacteriana tiempo dependiente, cuya mayor eficacia está correlacionada con el tiempo durante el cual las concentraciones libres en plasma/suero se mantienen por encima de la CIM del patógeno blanco. Dentro del grupo se pueden diferenciar dos subgrupos de acuerdo a su capacidad de inducir efecto post-antibiótico. Un subgrupo con mínima capacidad de inducir efecto post-antibiótico que incluye a los betalactámicos (penicilinas y cefalosporinas) y macrólidos (excepto azitromicina y tulatromicina). El otro subgrupo con capacidad de inducir efecto post-antibiótico moderadamente

persistente que incluye vancomicina, clindamicina, tetraciclina, azitromicina y tulatromicina (Vogelman y Craig, 1986; Vogelman y col. 1988; Ambrose y col. 2002)

El efecto post-antibiótico se define como el tiempo que le toma a un cultivo incrementar 1 log de ufc / ml en el momento en que las concentraciones de antimicrobianos ha disminuido por debajo de CIM, es decir, la inhibición del nuevo crecimiento bacteriano (Mouton y col., 2002)

Clásicamente en la relación farmacocinética/farmacodinámica, también llamada integración PK/PD, los parámetros farmacocinéticos más utilizados son el área bajo la curva de concentración plasmática/sérica de fármaco libre en función del tiempo entre 0 y 24 horas (AUC_{0-24}), la concentración plasmática/sérica máxima de droga libre alcanzada (C_{max}) y el tiempo (T) en que las concentraciones plasmáticas/séricas libres exceden una concentración umbral. El parámetro farmacodinámico más útil es la concentración inhibitoria mínima.

En investigaciones realizadas en los últimos años sobre la eficacia de antimicrobianos se han ensayado diversas relaciones PK/PD. Las que demostraron proveer información más confiable son el $AUC_{(0-24)}/CIM$, la C_{max}/CIM y el $T > CIM$ (Hyatt y col., 1995; Shojaee AliAbadi y Lees, 1997 ; Shojaee AliAbadi y Lees, 2000; Sanchez-Recio y col., 2000).

Antimicrobianos con cinética de muerte bacteriana concentración dependiente

Para este grupo de antimicrobianos los índices PK / PD de interés son C_{max} / CIM y AUC / CIM . (Craig, 1998).

El índice C_{max} / CIM refleja la relación entre la mayor concentración de fármaco libre alcanzado en el compartimiento de interés y la CIM. El índice AUC / CIM se refiere al área bajo la curva determinada normalmente en el período de 0 a 24 hs a partir de la integración tiempo y concentración. Cuando se utilizan otros períodos de tiempo, se debe indicar con un subíndice (Mouton y col. 2002), sin embargo, no es aconsejado el uso de un período diferente al 0-24 h.

Para los antimicrobianos con cinética de muerte bacteriana concentración dependiente la máxima eficacia se observa tras la administración de dosis altas con largos intervalos inter-dosis (generalmente 24 horas). Asimismo, altos índices C_{max} / CIM o AUC / CIM son necesarios para prevenir la selección de mutantes resistentes (Woodnutt, 2000).

El índice AUC/CIM es el predictor de la eficacia clínica/bacteriológica más utilizado en antimicrobianos concentración dependiente. El valor requerido es dependiente de la bacteria blanco; para bacterias Gram-positivas es 25-30 mientras que para bacterias Gram-negativas el valor aumenta a 100-125. Cabe aclarar, que el estado del sistema inmune del hospedador debe ser considerado; en animales inmunodeprimidos el valor requerido se duplica.

Antimicrobianos con cinética de muerte bacteriana tiempo dependiente

Para los antimicrobianos que han demostrado tener actividad dependiente del tiempo y carecen de capacidad de inducir efecto post-antibiótico, el éxito clínico se produce cuando la concentración de fármaco libre en plasma/suero excede la CIM de la cepa infectante durante más de 40-50% del intervalo de dosificación (Craig, 1998).

Para estos antimicrobianos el predictor de la eficacia clínica/bacteriológica es el período de tiempo durante el cual la concentración en el sitio de la infección está por encima de la CIM del patógeno blanco: $T > CIM$.

El valor de $T > CIM$ contra patógenos extracelulares se puede estimar a través de la concentración de fármaco libre en el suero/plasma, ya que generalmente es proporcional a la concentración en el líquido intersticial que rodea al microorganismo.

Para los beta-lactámicos, el valor óptimo de $T > CIM$ no es homogéneo y varía considerablemente de acuerdo al grupo. El más bajo se reporta para los carbapenems (15-25%), seguido por las penicilinas (30-40%). Los valores mayores corresponden a las cefalosporinas (40-50%) (Vogelman y col., 1988; Leggett y col., 1989; Craig, 1996; Craig y Andes, 1996; Craig, 1997; Craig, 1998).

Es importante remarcar que, a diferencia de lo mencionado para los antimicrobianos concentración dependiente, el valor óptimo de $T > CIM$ es independiente del tipo de patógeno, no reportándose diferencias entre microorganismos Gram-negativos y Gram-positivos.

Existen, sin embargo, antimicrobianos con cinética de killing tiempo dependiente con capacidad de inducir efecto post-antibiótico (vancomicina, clindamicina, tetraciclina, azitromicina y tulatromicina), en éstos la relación AUC/CIM es la que predice con más precisión la cura clínica/ bacteriológica. El valor óptimo del índice AUC/CIM reportado es de 25-35, independientemente de la bacteria blanco (Andes y col 2004).

Fortalezas y debilidades de la CIM como parámetro farmacodinámico:

La CIM es una medida simple, versátil, fácil de realizar, que permite que un gran número de microorganismos sean examinados simultáneamente. Sin embargo, está influenciada por factores como la densidad del inóculo, el medio, la temperatura y el tiempo de incubación, etc, que hacen imprescindible el uso de protocolos estandarizados (White y col. 2001).

Debido a que la CIM varía considerablemente entre las cepas de una misma especie, es una práctica habitual determinar su valor en muchos aislamientos (hasta varios cientos) y luego calcular los valores para el 50% y el 90% de la población bacteriana evaluada (CIM50 y CIM90, respectivamente).

En el registro de un producto antimicrobiano es usual basar la dosis seleccionada en el valor de CIM90 en vez de CIM100. Esto es porque, para cualquier población dada de microorganismos, comúnmente un pequeño porcentaje de aislamientos no son susceptibles, incluso a muy altas concentraciones de droga (bacterias viables no cultivables) (Colwell, 2000).

La importancia de la CIM como parámetro de la eficacia in vivo de un antimicrobiano es controversial. Las condiciones estandarizadas de la prueba (tamaño de inóculo definido, medios artificiales y concentraciones estáticas) son realmente diferentes de las esperadas en el sitio de infección. No obstante, la evidencia clínica y experimental indica una correlación entre la CIM y el efecto (Schentag, 1991; Craig, 1993; Knudsen y col., 1995; Preston y col., 1998).

La CIM asume un papel fundamental cuando se utiliza la integración farmacocinética/farmacodinámica, es decir para calcular los índices PK/PD ($T > CIM$; AUC/CIM y C_{max}/CIM).

Dos advertencias importantes referentes a esto deben ser mencionadas. Primero, la CIM es determinada por medio de diluciones dobles de la droga. La verdadera CIM no es generalmente la concentración determinada, sino que se encuentra entre la CIM observada y la siguiente dilución más baja. El error inherente es de una dilución en cualquier dirección. Por ejemplo, si a una concentración inicial de 4 $\mu\text{g/ml}$ se le realizan las siguientes diluciones en serie: 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 $\mu\text{g/ml}$ y la CIM estimada es de 1 $\mu\text{g/ml}$, el valor real podría ser estar entre 1.99 y 0.51 $\mu\text{g/ml}$. Por lo tanto, para propósitos de investigación, es aconsejable, para proporcionar una mayor precisión, determinar la CIM usando varias series superpuestas de doble dilución (Aliabadi y col., 2003; Aliabadi, 2003).

Evidentemente, esta imprecisión puede tener una influencia profunda para los índices PK/PD calculados (Frimodt-Moller, 2002).

La segunda advertencia se refiere al uso de la CIM₉₀ en el denominador para tener en cuenta la variación de la CIM en una especie bacteriana en particular. La CIM de un determinado fármaco para cepas de una población de bacterias donde ha

surgido resistencia a menudo supone una distribución bimodal. En tales casos, la CIM90 se incrementará de manera gradual. Por ejemplo, para el *Staphylococcus intermedius*, un aumento en la proporción de cepas resistentes a eritromicina de 9 a 10% significaría un aumento de la CIM90 de 1 (o menos) a más de 8 µg/ml (SVARM, 2001)

De esto se desprende que si la CIM90, o la CIM50 (la mediana), se utilizan para la integración PK/PD, sólo la cepa salvaje (inherentemente susceptible), debe ser considerada parte de la población (siempre que haya una distribución bimodal) (CVMP, 2002).

No obstante lo expresado, la CIM sigue siendo una razonable aproximación de la concentración de fármaco libre necesario en el sitio de la infección para provocar un efecto medible. (Drusano y col., 1984; Leggett y col., 1989; Schentag y col., 1991; Preston y col., 1998).

La CIM y el efecto post- antibiótico.

La CIM es, según la definición anterior, la menor concentración que inhibe el crecimiento bacteriano. Como se mencionó previamente, después de la exposición a concentraciones por encima de la CIM a menudo se puede observar un retraso en el nuevo crecimiento, incluso si el fármaco se elimina por completo. Se han estudiado, en este sentido, diversos tipos de efectos (Odenholt, 2001). De estos, la medida in vitro del efecto post-CIM (EPC) y el correspondiente efecto post antibiótico in vivo (EPA), son probablemente los de mayor relevancia clínica (Odenholt, 2001; den Hollander y col., 1998)

Sin embargo, la exposición de una bacteria a concentraciones más bajas (sub-CIM) puede resultar en una variedad de efectos tales como, tasa de crecimiento reducida, alteración tanto morfológica, de la ultraestructura, de la antigenicidad así como de la adhesión y la producción de toxinas (Lorian, 1993).

Por lo tanto, la magnitud y las consecuencias del EPA están directamente relacionadas con la concentración de antimicrobiano a la cual se exponen las bacterias. De este hecho surgen las hipótesis que relacionan el aumento de la resistencia bacteriana con poblaciones que han sido sometidas a concentraciones sub-CIM.

Concentraciones de fármacos de interés en el análisis farmacocinético

Una cuestión farmacocinética importante es el “sitio” en donde se mide la concentración del antimicrobiano. Idealmente, debería ser en el mismo lugar donde se encuentran los microorganismos causantes de la infección, pero esto es metodológicamente muy difícil.

Como el pasaje de las drogas disueltas en el plasma hacia el fluido extravascular generalmente es completo, una vez transcurrido el tiempo de equilibrio entre compartimientos, la concentración plasmática de droga libre brinda una adecuada medida de la concentración disponible en el sitio de la infección.

Por este motivo, en los cálculos farmacocinéticos y en los de PK/PD se utiliza la concentración de droga libre en el plasma (Schentag y col., 1985; Toutain y col., 2002; Toutain y Bousquet-Melou 2002).

Este principio no es válido cuando existen barreras fisiológicas (barrera hematoencefálica, próstata, ojo), patológicas (abscesos) o cuando las bacterias son de localización intracelular (micoplasmas) (Toutain y Bousquet-Melou 2002).

La misma consideración también podría aplicarse al estudio de antimicrobianos que se acumulan dentro de las células, como los macrólidos, lincosamidas y trimetoprima, entre otros (Gladue y col., 1989; McKellar y col., 2004).

Como la droga libre es la fracción farmacológicamente activa, los cálculos de los parámetros farmacocinéticos plasmáticos deben corregirse en función del grado de unión a proteínas plasmáticas que tenga el antimicrobiano. A los fines prácticos, este factor sólo es importante en aquellas drogas cuya fracción libre en el plasma es > 20% (Toutain y Bousquet-Melou, 2002) como sería el caso de clindamicina, sulfonamidas y doxiciclina.

En medicina veterinaria, las concentraciones totales en los tejidos siguen siendo frecuentemente reportadas, con el argumento de que altos "niveles en tejido" significan actividad antibacteriana superior. Esto puede ser muy engañoso debido a que dichas concentraciones son en su mayoría determinadas a partir de homogeneizados de tejido, y representan un promedio de las concentraciones de drogas dentro y fuera de las células y los capilares (Toutain y col., 2002). Alrededor del 80% del volumen del tejido corresponde al espacio intracelular; por lo tanto, las concentraciones tisulares totales en gran medida reflejan el grado de distribución de drogas dentro de las células (Nix y col., 1991). La mayoría de las infecciones de interés, sin embargo, se ubican a nivel extracelular, por lo tanto las comparaciones directas de las concentraciones tisulares totales con los parámetros farmacodinámicos carece de sentido (Cars, 1991).

Modelos experimentales para estudios PK/PD

Como se mencionó anteriormente, la mayor parte del conocimiento actual sobre la relación farmacocinética / farmacodinámica (PK/PD) de los antimicrobianos deriva de una variedad de modelos in vitro, ex vivo e in vivo.

Modelos in Vitro

Los modelos in vitro son una de las herramientas principales que se utilizan para el estudio PK/PD de los antimicrobianos. Poseen un número de características que los hacen excelentes para trabajos experimentales, como ser, flexibilidad, adaptabilidad, costo relativamente bajo, buena correlación con los datos entre animales y humanos, sin el contraste ético del trabajo animal.

En los modelos cinéticos in vitro, la dilución o difusión (a través de diálisis) se utiliza para simular el clearance de la droga desde el sistema (el organismo) (Grasso y col., 1978; Zinner, 1980; Toothaker y col., 1982). Estos modelos cinéticos, permiten, en un mismo estudio, definir diferentes perfiles de concentración-tiempo de una droga con una selección de cepas bacterianas en un ambiente controlado y reproducible. (MacGowan y col., 2000). A su vez, permiten estudiar diferentes aspectos de la relación PK / PD y determinar factores críticos, incluyendo la selección de la resistencia.

De esta manera, cuando se realizan estudios utilizando modelos in vitro existen varios puntos posibles que se pueden determinar, como ser:

A) Efecto antibacteriano

B) Determinación del índice PK/PD dominante sobre el efecto antibacteriano

C) Determinación de la magnitud del índice PK/PD dominante sobre el efecto antibacteriano.

D) Aparición de la resistencia a los antimicrobianos, la cual puede describir o analizar la importancia del índice PK / PD y su magnitud.

Sin embargo la información obtenida es incompleta y parcial; esto debe ser siempre considerado para evitar extraer conclusiones erróneas.

Modelos ex vivo

Estos modelos en general consisten en cajas tisulares desde las cuales se puede extraer transudado o, tras inducir una reacción inflamatoria, exudado. Estos fluidos son posteriormente enfrentados a cultivos bacterianos estandarizados a efectos de evaluar la actividad antibacteriana durante diversos periodos de tiempo, en general 24 h.

Estos modelos permiten el cálculo de las áreas bajo las curvas de inhibición ($AUIC_{24}$) correspondientes a bacteriostasis (sin cambios en el recuento de bacterias), actividad bactericida (99,9% de reducción del número de bacterias) o erradicación bacteriana total (Lees y Shojaee Aliabadi, 2002).

Falencias de modelos in vitro y ex vivo

Por lo expuesto anteriormente, es lógico deducir que estos modelos son herramientas útiles en la evaluación de las relaciones PK/PD de los

antimicrobianos ya que permiten obtener información básica para la predicción de la probabilidad de éxito clínico y/o microbiológico en una terapia antimicrobiana (MacGowan y Bowker, 2002). Sin embargo, varios autores han demostrado que los datos ofrecidos por dichos modelos son conflictivos, ya que su correlación con las situaciones in vivo son relativamente pobres (Marchbanks y col., 1993; Lacy y col., 1999; Lister y Sanders (A), 1999; Lister y Sanders (B), 1999; Bowker, 2000; Zinner y col., 2001). Asimismo, estudios de diferentes autores utilizando el mismo modelo conducen a resultados diferentes, lo que podría estar relacionado con diferentes estrategias de evaluación del efecto antibacteriano o uso de inóculos diferentes en densidad o fase de crecimiento bacteriano (Firsov y col., 1999). En este contexto, los efectos de la dilución y la presencia de bacterias sésiles (adherentes) pueden influir en los resultados (MacGowan y col., 2000).

En resumen, si bien los modelos in vitro y ex vivo son flexibles, adaptables y económicos, son también incompletos. Al simplificar las situaciones observadas in vivo (no considera la interacción hospedador: microorganismo: antimicrobiano) la información obtenida tras su aplicación es incompleta y sesgada, debiendo ser considerada con precaución.

Modelos in vivo

Los primeros modelos in vivo que se utilizaron para el estudio de la farmacodinamia de los antimicrobianos fueron modelos de infección en pequeños roedores como ratas, ratones, conejos y cobayos (Zak y O'Reilly, 1991; Andes y Craig, 2002)

Estos modelos pueden emular procesos infecciosos de características generales (infecciones del muslo, peritonitis, septicemia) o reflejar procesos infecciosos específicos (neumonía, meningitis, endocarditis, pielonefritis, abscesos). (Andes y Craig, 2002)

Como todo modelo experimental, los diferentes modelos in vivo desarrollados hasta la fecha tienen limitaciones generales y limitaciones propias que pueden afectar las conclusiones extraídas tras su aplicación. Entre las más importantes se pueden mencionar: a) la selección de cepas bacterianas, b) el tamaño del inóculo, c) el intervalo de tiempo entre la inducción de la infección y el inicio del tratamiento y d) el régimen de dosificación determinado (Cleeland y Squires, 1991).

Muchos modelos in vivo utilizan, para describir la curva dosis-respuesta y discriminar parámetros cuantitativos del efecto antibiótico, ratones neutropénicos (Vogelman y col., 1988; Leggett y col., 1990). Esto es una limitación importante de este tipo de modelos ya que, al trabajar con animales inmunodeprimidos cualquier infección bacteriana se convierte rápidamente en septicémica. En consecuencia los resultados de estos estudios están acotados a ese tipo de patología.

En los últimos años se han diseñado diferentes modelos para el estudio in vivo de los antimicrobianos que incluyen actividad inmune. Dentro de ellos, se encuentran los modelos llamados “de dispositivos de fluido tisular” (TCF, tissue cage fluid) que

constan de cajas tisulares implantadas a nivel subcutáneo; estos dispositivos son infectados con la bacteria en estudio lo que conduce a la formación de un absceso, una vez consolidado el mismo se inicia el tratamiento antimicrobiano a ser evaluado (Rylander y col., 1978).

Una limitación de este modelo es consecuencia de la alta concentración de leucocitos presentes en el absceso (fundamentalmente los neutrófilos con su alta capacidad oxidativa local y en consecuencia la formación de pus). Esto dificulta la interpretación de la causa de la disminución del conteo bacteriano en el absceso formado y limita el número de antimicrobianos a ser estudiados (ciertos antimicrobianos pierden actividad en presencia de pus).

Otra limitación importante de estos modelos está relacionada con el bienestar animal. La severidad de la reacción local y sistémica que inducen en el animal experimental los transforman en poco éticos y deberían ser suplantados por modelos más inocuos para el animal experimental.

Wagner y col., en 1986 diseñaron un modelo que permite la evaluación simultánea de los niveles de antibióticos en tejidos y el porcentaje de muerte bacteriana. Dicho modelo, desarrollado en caninos, utiliza una cámara Sykes-Moore recubierta con membrana Millipore de 0.22 μm , a efectos de evitar el escape de las bacterias desde el interior de la cámara.

Si bien el modelo fue exitoso en evitar la fuga bacteriana y en consecuencia la reacción local, el tamaño de las cámaras implantadas y el discomfort inducido en el animal experimental obligó a mantenerlos bajo anestesia general durante todo el estudio, que no pudo superar las 8 horas de duración. Hoy en día, tampoco es justificable utilizar un animal de experimentación bajo estas condiciones por esa

cantidad de horas. Si el modelo no ofrece una posibilidad de evaluación a largo plazo de los tratamientos antibióticos a ser estudiados pierde aplicabilidad.

Greko y col., en el 2003 desarrollaron un modelo de cajas tisulares en terneros, las cuales estaban diseñadas con una membrana millipore de 0.45 μm para evitar la fuga de bacterias del interior de las mismas. El inconveniente de este modelo es que la terapia antimicrobiana se realizaba inoculando con aguja directamente sobre las cajas. Lo que producía, en definitiva, la ruptura de las membranas con el consecuente escape de las bacterias al exterior y la producción de una zona inflamatoria con la alteración de los parámetros fisiológicos normales del animal.

Basado en lo expuesto queda claro que en la actualidad se carece de un modelo *in vivo* aceptable que permita estudiar de forma integrada la farmacocinética y farmacodinamia de los antimicrobianos. Es importante aclarar que aceptable significa que produzca información de calidad científica y al mismo tiempo respete el bienestar de los animales experimentales.

A efectos de solucionar esa carencia, nos planteamos diseñar un modelo *in vivo* para el estudio de la farmacodinámica de los fármacos antimicrobianos, que cubriera las debilidades de los modelos desarrollados hasta la fecha, respetando el bienestar animal.

Para alcanzar esa meta nos planteamos los siguientes objetivos parciales:

- .- Diseñar un dispositivo de implantación subcutánea que permita el estudio *in vivo* del crecimiento bacteriano.
- .- Estudiar las reacciones de los tejidos circundantes a la presencia del dispositivo.
- .- Comparar las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de dispositivos implantados en conejos y cultivados en estufa a 37°C.

- .- Estudiar la curva de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente en conejos tratados con cefalexina (cinética de killing bacteriano tiempo dependiente) administrada por las vías intravenosa e intramuscular aplicando esquemas de dosificación de "meseta" y de "pico".
- .- Describir la cinética plasmática de cefalexina tras su administración intravenosa e intramuscular en conejos con esquemas de dosificación de "meseta" y de "pico".
- .- Estudiar la curva de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente en conejos tratados con ciprofloxacina (cinética de killing bacteriano concentración dependiente) administrada por las vías intravenosa e intramuscular con esquemas de dosificación de "meseta" y de "pico".
- .- Describir la cinética plasmática ciprofloxacina tras su administración intravenosa e intramuscular en conejos con esquemas de dosificación de "meseta" y de "pico".
- .- Aplicar modelamiento PK/PD a los datos obtenidos e identificar la correlación entre los diferentes parámetros farmacocinéticos y las curvas de muerte bacteriana.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló , de acuerdo a los objetivos planteados, en tres etapas consecutivas:

ETAPA 1.- Diseño y evaluación de la inocuidad y aplicabilidad de un dispositivo de implantación subcutánea (DIS) que permita el análisis *in vivo* del crecimiento bacteriano.

Esta etapa incluyó los siguientes estudios:

- ✓ Estudio de inocuidad del DIS (incisos 1.1)
- ✓ Estudio comparativo del crecimiento bacteriano en dispositivos implantados subcutáneamente en conejos y cultivados en estufa de cultivo a 37°C. (incisos 1.2)

ETAPA 2.- Puesta a punto de los métodos analíticos

- ✓ Puesta a punto del método microbiológico para el dosaje de cefalexina en plasma (inciso 2.1)
- ✓ Puesta a punto del método microbiológico para el dosaje de ciprofloxacina en plasma (inciso 2.2)

ETAPA 3.- Validación del modelo desarrollado a través del análisis de la curva de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados

subcutáneamente en conejos tratados con cefalexina, como representante del grupo de antimicrobianos con cinética de killing bacteriano tiempo dependiente.

Esta etapa comprendió los siguientes estudios:

- ✓ Descripción de la disposición plasmática de cefalexina tras su administración intravenosa en conejos con esquemas de dosificación de "meseta" y de "pico" (incisos 3.1, 3.2).
- ✓ Descripción de la disposición plasmática de cefalexina tras su administración intramuscular en conejos con esquemas de dosificación de "meseta" y de "pico" (incisos 3.3 y 3.4).
- ✓ Integración cinético/dinámica de los datos obtenidos en los estudios realizados con cefalexina e identificación de la correlación entre los diferentes parámetros farmacocinéticos y las curvas de muerte bacteriana (inciso 5)

ETAPA 4.- Validación del modelo desarrollado a través del análisis de la curva de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente en conejos tratados con ciprofloxacina como representante del grupo de antimicrobianos con cinética de killing bacteriano concentración dependiente.

Esta etapa comprendió los siguientes estudios:

- ✓ Descripción de la disposición plasmática de ciprofloxacina tras su administración intravenosa en conejos con esquemas de dosificación de "meseta" y de "pico" (incisos 4.1, 4.2)

- ✓ Descripción de la disposición plasmática de ciprofloxacina tras su administración intramuscular en conejos con esquemas de dosificación de "meseta" y de "pico" (incisos 4.3 y 4.4)

- ✓ Integración cinético/dinámica de los datos obtenidos en los estudios realizados con ciprofloxacina e identificación de la correlación entre los diferentes parámetros farmacocinéticos y las curvas de muerte bacteriana (inciso 5)

Lugar de trabajo:

Todas las experiencias correspondientes al presente trabajo se realizaron en el Laboratorio de Farmacología General de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

Para el mantenimiento de los animales y realización de los muestreos se utilizaron instalaciones acondicionadas para tal fin.

Materiales

- Animales: para los estudios experimentales reportados se utilizó un total de 40 conejos raza New Zealand, todos ellos machos, los cuales fueron comprados a la Cátedra de Zootecnia de la Facultad de Agronomía de la Universidad de La Plata. El rango de pesos de los animales durante los ensayos fue de entre 2.5 y 3 kg.

Los animales experimentales fueron alojados en el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, en jaulas de 102 x 77 x 86 cm con comedero tipo tolva, sistema chupete para el agua, extractor automático de aire que permitía 15 recambios de aire/ hora y libre acceso a la luz natural. Dichas instalaciones permitieron contar con alimentación y agua ad-libitum. Se utilizó balanceado seco, sin coccidiostático, para que no interfiriera con el tratamiento antibiótico (Conejo Casero, Gepsa Feeds, Grupo Pilar S.A, Argentina).

Los animales fueron tratados humanitariamente según las normas internacionales estipuladas por los comités de ética profesional para el manejo y uso de animales de experimentación (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Eighth Edition, 2010; The Laboratory Rabbit, 2007). A su vez fui entrenada para el cuidado y manejo de procedimientos experimentales en los animales de experimentación por el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata en el curso anual correspondiente a la Carrera de Microbiología Clínica e Industrial,

especializándome posteriormente con el curso de Procedimientos experimentales en pequeños animales de experimentación.

Cada animal fue utilizado una sola vez; una vez concluido el estudio del cual formaban parte los conejos eran (previo un periodo de observación de 15 días) entregados a personas que los adoptaban como mascotas.

- Material biológico:

- Microorganismo problema para la evaluación comparativa del crecimiento bacteriano en el DIS vs estufa.

Escherichia coli ATCC 25922

- Microorganismos patrones para la determinación de las concentraciones antimicrobianas:

Kocuria rhizophila ATCC 9341 (previamente denominado *Micrococcus luteus*)

Klebsiella pneumoniae ATCC 10031

- Microorganismos problema para la evaluación de la actividad antimicrobiana en el interior del DIS:

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

- Muestras de plasma problema
- Plasma normal de conejo para la construcción de la curva estándar (30 ml para cada antimicrobiano)

- Drogas utilizadas para la construcción de la curva estándar:
 - Cefalexina clorhidrato. Referencia C4895. Laboratorio Sigma-Aldrich.
 - Ciprofloxacina clorhidrato. Laboratorio Parafarm.
- Drogas utilizadas en los ensayos antimicrobianos:
 - Cefalexina lisina, solución inyectable 1gr. (Cefalexina[®]Laboratorio Richet).
 - Ciprofloxacina 200 mg, solución inyectable. (CIRIAX 200[®], Laboratorio Roemmers).
- Drogas empleadas en la implantación y extracción de los DIS y muestreos sanguíneos:
 - Acepromacina (Acedán[®], Holliday-Scott, Argentina)
 - Butorfanol, solución inyectable (Butormin[®], Holliday-Scott, Argentina)
 - Heparina 5000 UI/mL (Sabrius[®], Fada, Ind. Argentina)
 - Ketamina (Ketamina 50[®], Holliday-Scott, Ind. Argentina)
 - Xilacina 2% (Alfasan[®], WOERDEN-HOLLAND, Ind. Holandesa)
 - Lidocaína c/epinefrina (Lidocaína, Scott Cassara, Ind.Argentina)
 - Agua oxigenada 10 volúmenes
 - Alcohol etílico 96°C
 - Povidona yodada en solución
 - Solución fisiológica de cloruro de sodio
- Material utilizado en la fabricación de los DIS:
 - Cápsulas de polipropileno de 12 mm de diámetro por 10 mm de profundidad, con una abertura de 9 mm.

- Membrana Millipore de 24nm.
- Adhesivo de poliacrilamida
- Adhesivo termofusible
- Material quirúrgico y descartable utilizado en la implantación de los DIS:
 - Hilo de sutura de nylon 0,1 mm.
 - Guantes estériles
 - Aguja 0,80 x 25 mm (21G x 1")
 - Gasa estéril
 - Tijera quirúrgica 14 cm aguda/aguda, recta.
 - Tijera quirúrgica 14 cm roma/roma, recta.
 - Porta agujas Mayo de 14 cm
 - Separadores quirúrgicos
 - Pinza disección sin dientes 125 mm
 - Pinza quirúrgica 1-2 dientes 30 cm
 - Hoja de bisturí N° 24
 - Mango para bisturí N° 4
 - Hoja de afeitar doble filo (Schick)
- Material utilizado en el muestreo sanguíneo:
 - Jeringas descartables estériles 1 ml
 - Tubos de ensayo de vidrio de 16ml
 - Tubos Eppendorf®
 - Algodón
 - Catéteres intravenosos 24 G (Abbocath-T®, Venisystems™ , Abbott, Ireland)

- Gradillas para tubos de vidrio y para tubos Eppendorf®
- Tela adhesiva
- Cinta papel
- Tapones para catéteres
- Freezer (-20°C)

- Reactivos, material descartable y de laboratorio:
 - Agar Muller Hinton (Biokar Diagnostics)
 - Agar Sangre (preparación propia)
 - Caldo cerebro corazón (Biokar Diagnostics)
 - Balanza analítica (Adventurer™, OHAUS®, Corp. USA)
 - Centrífuga (Rolco, Científica Central, Argentina)
 - Bomba de vacío (Silfab®, Argentina)
 - Agitador (Thorbell, Equipos para Laboratorio, Ind. Argentina)
 - Estufa de cultivo, a 37°C (SAN-JOR®, Argentina)
 - Estufa de secado
 - Mechero Bunsen
 - Pipetas automáticas de 100, 200 y 1000 µl (Gilson®) y tips estériles
 - Pipetas de vidrio 1, 5 y 10 ml
 - Sacabocados de 7 mm de diámetro interno y 9 mm de diámetro externo
 - Software de computadora para el cálculo de las concentraciones a partir de la curva estándar (Microsoft Office Excel 2003)

- Software de computadora para el cálculo de los parámetros farmacocinéticos (WinNonlin[®] SCI Software)
- Tubos de ensayo de vidrio de 16 ml
- Solución fisiológica
- Placas para agar estériles descartables 90 mm de diámetro x 15 mm de alto.
- Placas para agar de vidrio de 90 mm de diámetro x 17 mm de alto.
- Placas para agar de vidrio 145 mm de diámetro x 25 mm de alto.
- Jeringas descartables estériles 2,5 ml
- Tubos de ensayo gordos de vidrio de 50 ml
- Autoclave
- Heladera (4°C)
- Agua destilada

MÉTODOS:

ETAPA 1

Diseño y evaluación de la inocuidad y aplicabilidad de un dispositivo de implantación subcutánea (DIS) que permita el análisis *in vivo* del crecimiento bacteriano.

1.1) Estudio de inocuidad del DIS:

1.1.a) Preparación de los dispositivos de implantación subcutánea.

Los dispositivos de implantación subcutánea consistieron en cápsulas de polipropileno de 12 mm de diámetro por 10 mm de profundidad, con una abertura de 9 mm (Ver foto 1). Para este estudio se prepararon 8 dispositivos, 4 de los cuales se rellenaron con solución fisiológica y los otros 4 con caldo cerebro corazón. Una vez rellenados todos los DIS fueron cerrados con membranas Millipore de 24nm, las cuales fueron adheridas a la boca del DIS con poliacrilamida. Luego se reforzó el cierre con arandelas de polipropileno adheridas también con poliacrilamida y selladas con adhesivo termofusible.

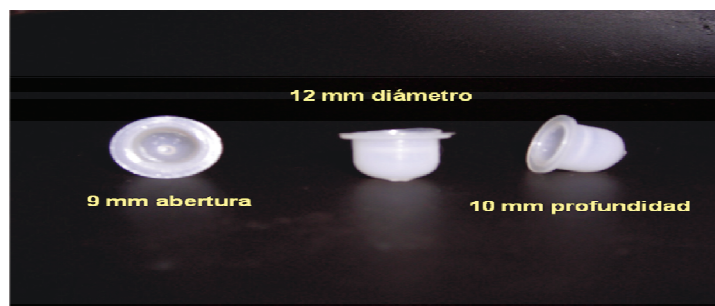


Foto 1. Dispositivos de implantación subcutánea

1.1.b) Implantación subcutánea del DIS en conejo

Se utilizaron 2 conejos machos con un peso de 2.7 ± 0.7 kg. Los mismos fueron sedados con la combinación buprenorfina, ketamina y xilacina a la dosis de 0.05, 25 y 1 mg/kg, respectivamente, administrada por vía intramuscular. Posteriormente el área dorsal fue depilada y desinfectada con yodo povidona.

En la zona de implantación se realizaron 4 incisiones con bisturí; el tejido subcutáneo debajo de cada incisión fue divulsionado con tijera quirúrgica hasta formar un bolsillo subcutáneo. En cada uno de éstos se introdujo un DIS (dos

conteniendo 300 µl de solución fisiológica o el mismo volumen de caldo cerebro corazón). Posteriormente la herida se suturó con nylon 0.1 mm y se registró el horario de colocación de los dispositivos.

1.1.c) Toma de muestras

Para la extracción de los DIS se aplicó sedación (con la combinación mencionada previamente) y anestesia local (lidocaína). Los DIS fueron extraídos a las 24 y 72 h post-inserción. De cada bolsillo subcutáneo se extrajo una muestra de tejido por biopsia para la realización de estudios histopatológicos; los mismos fueron llevados a cabo en el Laboratorio de Patología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. El líquido contenido en cada DIS fue recuperado a efectos de evaluar los cambios en sus parámetros fisicoquímicos.

1.2. Estudio comparativo del crecimiento bacteriano en el interior de dispositivos implantados subcutáneamente en conejos e incubados en estufa de cultivo a 37°C:

1.2.a) Preparación de los dispositivos de implantación subcutánea:

Alícuotas de 200 µl de un inóculo de *Escherichia coli* ATCC 25922 con una densidad bacteriana de 1×10^5 ufc/ml fueron introducidas en un total de 32 DIS, adicionándose posteriormente 100 µl de caldo cerebro corazón en cada uno de ellos.

Una vez rellenos todos los DIS fueron cerrados aplicando la metodología descrita en el apartado 1.1.a.

1.2.b) Implantación subcutánea del DIS en conejo y en estufa:

Se trabajó con cuatro conejos machos de pesos comprendidos entre 2.6 y 2.8 kg, los cuales fueron sedados con la administración intramuscular de la combinación buprenorfina, ketamina y xilacina a la dosis de 0.05, 25 y 1 mg/kg, respectivamente.

El área dorsal de cada animal fue depilada y desinfectada de la manera descrita en el punto 1.1.b. En la zona de implantación se realizaron 4 incisiones con bisturí las que fueron divulsionadas con tijera quirúrgica hasta formar un bolsillo subcutáneo, en cada uno de los cuales se colocó un DIS. Posteriormente se suturó con nylon y se registró el horario de colocación de los dispositivos.

En simultáneo, los 16 DIS remanentes fueron introducidos en tubos de ensayo conteniendo 5 ml de caldo cerebro corazón y llevados a estufa de cultivo a 37°C.

1.2.c) Toma de muestras:

Los DIS fueron extraídos asépticamente de cada conejo bajo sedación y anestesia local a las 12, 24, 48 y 72 hs post-implantación. El contenido fue recuperado para el conteo bacteriano. El mismo procedimiento fue aplicado a los dispositivos incubados en estufa (no implantados).

Tras la extracción de los DIS, a efectos de evaluar el correcto cierre de los dispositivos, el interior de cada bolsillo subcutáneo fue barrido con un hisopo estéril,

el cual fue sembrado en agar sangre y llevado a estufa de cultivo a 37°C por 18 horas.

ETAPA 2

Puesta a punto de los métodos analíticos:

Método microbiológico para el dosaje de antimicrobianos:

Este método se basa en la asunción de que la inhibición del crecimiento de los microorganismos es directamente proporcional a las concentraciones de antimicrobiano a las que se enfrentan. Para visualizar esta inhibición se debe hacer crecer el microorganismo en un soporte sólido (agar) en presencia del antimicrobiano a evaluar, en nuestro caso, dentro de un pocillo creado en el espesor del agar. La inhibición del crecimiento, según los principios de difusión, se visualiza como un halo sin colonias bacterianas alrededor del sitio en que se ha colocado el antimicrobiano. El grado de difusión del antimicrobiano a través del agar es directamente proporcional a la concentración del mismo. En el perímetro del halo encontramos la menor concentración de antimicrobiano que ha sido capaz de inhibir el crecimiento del microorganismo, es decir que coincide, teóricamente, con el valor de la CIM para esa bacteria.

Si se construye una curva de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos (variable dependiente) en función de la concentración del antimicrobiano (variable independiente) y esta curva es validada (curva estándar), se puede extrapolar la concentración de antimicrobiano presente en una muestra problema interpolando en la curva estándar el valor del diámetro de halo de inhibición obtenido.

Para que la determinación sea válida, el método debe cumplir ciertos requisitos: (a) la curva debe estar validada, (b) las concentraciones de antimicrobiano en la

muestra problema deben estar comprendidas dentro del rango de la curva estándar y (c) las condiciones del ensayo deben ser las mismas a las empleadas en la construcción de la curva estándar.

Los criterios de validación de la curva son los siguientes:

Precisión: los coeficientes de variación ($DS/ \text{media} \times 100$) de los diámetros de los halos de inhibición deben ser $\leq 15\%$ para todas las concentraciones, aunque para el límite de cuantificación (LOQ) se acepta hasta un 20% de variación.

Exactitud: los valores de las concentraciones estimadas deben ser $\pm 15\%$ del valor de concentración observada para todos los puntos, excepto para la concentración correspondiente al LOQ para la cual se acepta $\pm 20\%$.

Regresión: la recta de regresión debe ser estadísticamente significativa para la regresión y no significativa para la desviación de la linealidad. El coeficiente de correlación (r^2) debe ser ≥ 0.95 .

2.1) Puesta a punto del método microbiológico para el dosaje de cefalexina en plasma de conejo:

Para la construcción de la curva de calibración de cefalexina se empleó un microorganismo sensible, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 (previamente denominado *Micrococcus luteus*, (Tang y Gillevet, 2003)) incluido en agar Mueller Hinton en una concentración conocida y diluciones crecientes del antimicrobiano a ensayar.

Se prepararon diluciones de cefalexina en solución fisiológica y en plasma de conejo a partir de una dilución de 10000 $\mu\text{g/ml}$ (solución madre o stock) la cual fue mantenida en freezer a $- 20^\circ\text{C}$ por un período no mayor de 15 días. A partir de esta

dilución se prepararon el resto de las soluciones patrones: 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,56; 0,78 y 0,39 µg/ml.

Las concentraciones de la curva estándar se seleccionaron procurando que la concentración más alta excediera a la máxima concentración plasmática esperada, y la mínima fuese inferior al LOQ. De tal modo que las concentraciones de antimicrobiano en todas las muestras problema estuvieran comprendidas dentro del rango de concentraciones de la curva estándar.

La curva estándar se sembró en placas que contenían el microorganismo patrón incluido en el medio de cultivo a fin de garantizar un crecimiento uniforme. Para que la concentración del inóculo (cantidad de microorganismos por ml de medio) fuera uniforme en todas las placas, se estandarizó la cantidad de caldo de cultivo que debía agregarse al agar. La metodología seguida fue la siguiente:

Preparación de la cepa patrón:

Dos días antes de la realización de la prueba, se sembró una placa de agar Mueller Hinton, en estría, con *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 y se incubó a 37°C. El día previo al ensayo, se realizó un repique en 5 ml de caldo de cultivo cerebro corazón el cual se incubó por 18 h a 37°C, asegurando así que las bacterias en el inóculo se hallaran en la fase de crecimiento logarítmico.

El día del ensayo el caldo cerebro corazón inoculado con la cepa patrón alcanzaba una turbidez grado 1 en la escala de Mac Farland; del mismo 460 µl fueron adicionados a 28 ml de agar Mueller Hinton fundido a 37°C (este volumen es suficiente para preparar una placa). El agar inoculado rápidamente se vació en

placas de vidrio estériles girando las mismas 5 veces a favor y en contra de las agujas del reloj permitiendo una mezcla homogénea del inóculo. Se dejó solidificar el agar y las placas cerradas fueron colocadas durante una hora en heladera.

Transcurrido este lapso de tiempo se procedió a realizar los pocillos en el espesor del agar mediante un sacabocados estéril conectado a una bomba de vacío. A fin de obtener una correcta distribución de los pocillos y poder numerar las muestras a analizar, se colocó una numeración del 1 al 10 sobre la superficie externa del vidrio inferior de cada placa con la ayuda de un plano de circunferencia mostrando los pocillos distribuidos de manera equidistante. Luego de haberse realizado todos los pocillos se procedió a cargarlos con 50 µl de las diluciones patrones.

Una vez cargados todos los pocillos, la placa se cerró con la tapa de vidrio, dejándola a temperatura ambiente por un lapso de 1 h (tiempo de pre-difusión del antimicrobiano). Luego se llevó a estufa de cultivo a 37°C por 18 h.

Una vez transcurrido el período de incubación, los diámetros de los halos de inhibición fueron medidos con calibre milimetrado con una precisión de 0.1mm y los valores obtenidos fueron tabulados en una planilla.

Cálculo de las concentraciones a partir de los halos de inhibición:

La curva de calibración se construyó graficando en escala aritmética los valores obtenidos (media de los replicados) para cada concentración ensayada (variable dependiente) en función de la concentración de antimicrobiano (variable independiente).

Para la construcción de la curva y su validación se utilizaron programas computarizados (Excell y Graph Pad Prism). Con estos programas se calculó la curva de regresión lineal, por el método de los mínimos cuadrados, que garantiza el mejor ajuste de los puntos observados a la recta teórica.

La ecuación correspondiente es la de la recta:

$$y = a + bx$$

Donde:

“y” es el valor del diámetro del halo, “a” es la ordenada al origen, “b” es la pendiente de la recta, y “x” la concentración.

Entonces:

$$\text{Concentración} = (\text{diámetro del halo de inhibición} - \text{ordenada al origen}) / \text{pendiente}$$

Para validar este método se calculó el coeficiente de correlación y los análisis de varianza para la regresión y la linealidad de la curva estándar. También se calcularon los coeficientes de variación para los valores de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos en las distintas placas y distintos días (CV intradía e interdía), y se verificó que los valores observados y estimados de las concentraciones fueran equivalentes ($\pm 15\%$)

Determinación de las concentraciones de las muestras problema:

Para el cálculo de las concentraciones plasmáticas de cefalexina tras su administración por las diferentes vías y con los diferentes esquemas de

administración ensayados, el procedimiento fue básicamente el mismo que el reportado para la construcción de la curva estándar.

En cada placa se sembraron 10 muestras por duplicado, dejándose 1 pocillo control negativo con solución fisiológica y 1 pocillo control positivo con una concentración conocida de cefalexina. Después de medir los halos de inhibición de las muestras problema se calcularon las concentraciones del antimicrobiano interpolando el valor promedio de los replicados a la curva estándar promedio.

2.2) Puesta a punto del método microbiológico para ciprofloxacina:

El procedimiento experimental fue similar al descrito previamente para cefalexina. Las diferencias, como es obvio, radican en la cepa bacteriana utilizada. Para ciprofloxacina se utilizó como cepa patrón a *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, ajustándose el modo de preparación a las características de cultivo de la cepa.

El día previo al ensayo se realizó un repique en estría sobre agar Mueller Hinton y se cultivó durante 18 h en estufa a 37°C. Luego se repicó la cepa en 5 ml de caldo cerebro corazón y se la llevó a estufa de cultivo durante 3 h a 37°C. Transcurrido ese lapso de tiempo, el inóculo alcanzó una turbidez grado 1 en la escala Mac Farland, y fue utilizado en la proporción 1 ml cada 100 ml de agar Mueller Hinton.

En esta ocasión, se prepararon diluciones de ciprofloxacina en solución fisiológica y en plasma de conejo a partir de una dilución de 10000 µg/ml (solución madre o stock) la cual fue mantenida en freezer a – 20°C por un período no mayor de 15 días. A partir de esta dilución se prepararon el resto de las soluciones patrones: 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,56; 0,78, 0,39 y 0,19 µg/ml.

El resto del procedimiento fue igual al descrito previamente para el dosaje de cefalexina.

ETAPA 3

Validación del modelo desarrollado a través del análisis de la curva de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente en conejos tratados con cefalexina, como representante del grupo de antimicrobianos con cinética de killing bacteriano tiempo dependiente.

3.1) Descripción de la disposición plasmática de cefalexina tras su administración intravenosa a dosis única de 10 mg/kg.

3.1.a) Preparación de los dispositivos de implantación subcutánea (DIS):

En este estudio se preparó un inóculo de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en una concentración de 1×10^5 ufc/ml en solución fisiológica estéril; de dicho inóculo se tomaron 200 μ l por vez y se colocaron en 24 DIS. A cada uno de éstos se les agregó 100 μ l de caldo cerebro corazón.

Una vez rellenados todos los DIS fueron cerrados de la manera descrita en el punto 1.1.a

3.1.b) Implantación subcutánea del DIS:

Se trabajó con cuatro conejos machos con un peso promedio de 3.0 ± 0.85 kg, los cuales fueron sedados y preparados para el acto quirúrgico de la manera descrita en el apartado 1.1.b.

En la zona de implantación se realizaron 6 bolsillos subcutáneos, en cada uno de los cuales se introdujo un DIS. Posteriormente se suturó con nylon y se registró el horario de colocación de los dispositivos.

3.1.c) Tratamiento antibiótico y toma de muestras:

Veinticuatro horas post cirugía, un catéter (Abbocat) 24 G fue colocado en la vena marginal en ambas orejas en todos los animales experimentales, fijándosele con cinta adhesiva. El catéter colocado en la oreja derecha fue utilizado para la administración del antimicrobiano y el restante para la extracción de muestras sanguíneas. El catéter utilizado para la administración fue enjuagado y mantenido durante todo el estudio, reservándose su uso a casos de emergencia, por ejemplo bloqueo o pérdida del catéter de extracción.

Una solución de cefalexina al 2 % fue administrada por vía intravenosa a la dosis de 10 mg/kg, registrando dicho evento como hora 0.

Los DIS fueron extraídos asépticamente de cada conejo bajo sedación y anestesia local a las 0.5, 1, 3, 6, 9 y 24 h post-administración, recuperándose el contenido para el conteo bacteriano. Simultáneamente, se extrajo 1 ml de sangre para el dosaje de las concentraciones de cefalexina.

Las concentraciones de cefalexina en las muestras sanguíneas obtenidas fueron cuantificadas por método microbiológico utilizando *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 como microorganismo test.

3.2) Descripción de la disposición plasmática de cefalexina tras su administración intravenosa a dosis de 2.5 mg/kg/6h durante un período de 24 horas

3.2.a) Preparación de los dispositivos de implantación subcutánea (DIS):

Idem al estudio 3.1.a

3.2.b) Implantación subcutánea del DIS en conejo :

Idem al estudio 3.1.b

3.2.c) Tratamiento antibiótico y toma de muestras:

Veinticuatro horas post cirugía, un catéter (Abbocat) 24 G fue colocado en la vena marginal en ambas orejas en todos los animales experimentales, fijándosele con cinta adhesiva. El catéter colocado en la oreja derecha fue utilizado para la administración del antimicrobiano y el restante para la extracción de muestras sanguíneas. El catéter utilizado para la administración fue enjuagado y mantenido durante todo el estudio, reservándose su uso a casos de emergencia, por ejemplo bloqueo o pérdida del catéter de extracción.

Una solución de cefalexina al 2 % fue administrada por vía intravenosa a la dosis de 2.5 mg/kg cada 6 horas, registrando el final de la primera administración como tiempo 0.

Los DIS fueron extraídos asépticamente de cada conejo bajo sedación y anestesia local a las 3, 6, 9, 12, 18 y 24 h post-administración, recuperándose el contenido

para el conteo bacteriano. Simultáneamente, se extrajo 1 ml de sangre para el dosaje de las concentraciones de cefalexina.

3.3) Descripción de la disposición plasmática de cefalexina tras su administración intramuscular a dosis única de 10 mg/kg.

3.3.a) Preparación de los dispositivos de implantación subcutánea (DIS):

Idem al estudio 3.1.a

3.3.b) Implantación subcutánea del DIS en conejo :

Idem al estudio 3.1.b

3.3.c) Tratamiento antibiótico y toma de muestras:

El procedimiento fue el mismo que en el estudio 3.1.c, la única diferencia fue la vía de administración de la cefalexina, siendo en este caso la vía intramuscular.

3.4) Descripción de la disposición plasmática de cefalexina tras su administración intramuscular a dosis de 2.5 mg/kg/6h durante un período de 24 horas

3.4.a) Preparación de los dispositivos de implantación subcutánea (DIS):

Idem al estudio 3.1.a

3.4.b) Implantación subcutánea del DIS en conejo :

Idem al estudio 3.1.b

3.4.c) Tratamiento antibiótico y toma de muestras:

El procedimiento fue el mismo que en el estudio 3.2.c, la única diferencia fue la vía de administración de la cefalexina, siendo en este caso la vía intramuscular.

ETAPA 4

Estudio de la curva de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente en conejos tratados con ciprofloxacina (cinética de killing bacteriano concentración dependiente) con esquemas de dosificación de "meseta" y de "pico".

4.1) Descripción de la disposición plasmática de ciprofloxacina tras su administración intravenosa a dosis única de 30 mg/kg.

4.1.a) Preparación de los dispositivos de implantación subcutánea (DIS):

Idem estudio 3.1.a. Con la única excepción que el inóculo bacteriano fue preparado con *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

4.1.b) Implantación subcutánea del DIS:

Idem estudio 3.1.b

4.1.c) Tratamiento antibiótico y toma de muestras:

Veinticuatro horas post cirugía, un catéter (Abbocat) 24 G fue colocado en la vena marginal en ambas orejas en todos los animales experimentales, fijándosele con cinta adhesiva. El catéter colocado en la oreja derecha fue utilizado para la administración del antimicrobiano y el restante para la extracción de muestras sanguíneas. El catéter utilizado para la administración fue enjuagado y mantenido

durante todo el estudio, reservándose su uso a casos de emergencia, por ejemplo bloqueo o pérdida del catéter de extracción.

Una solución de ciprofloxacina al 10 % fue administrada por vía intravenosa a la dosis de 30 mg/kg, registrando dicho evento como hora 0.

Los DIS fueron extraídos asépticamente de cada conejo bajo sedación y anestesia local a las 0.5, 1, 3, 6, 9 y 24 h post-administración, recuperándose el contenido para el conteo bacteriano. Simultáneamente, se extrajo 1 ml de sangre para el dosaje de las concentraciones de ciprofloxacina.

Las concentraciones de ciprofloxacina en las muestras sanguíneas obtenidas fueron cuantificadas por método microbiológico utilizando *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 como microorganismo test.

4.2) Descripción de la disposición plasmática de ciprofloxacina tras su administración intravenosa a dosis de 7.5 mg/kg/6h durante un período de 24 horas

4.2.a) Preparación de los dispositivos de implantación subcutánea (DIS):

Idem al estudio 3.1.a

4.2.b) Implantación subcutánea del DIS en conejo :

Idem al estudio 3.1.b

4.2.c) Tratamiento antibiótico y toma de muestras:

Veinticuatro horas post cirugía, un catéter (Abbocat) 24 G fue colocado en la vena marginal en ambas orejas y en todos los animales experimentales, fijándosele con cinta adhesiva. El catéter colocado en la oreja derecha fue utilizado para la administración del antimicrobiano y el restante para la extracción de muestras

sanguíneas. El catéter utilizado para la administración fue enjuagado y mantenido durante todo el estudio, reservándose su uso a casos de emergencia, por ejemplo bloqueo o pérdida del catéter de extracción.

Una solución de ciprofloxacina al 10 % fue administrada por vía intravenosa a la dosis de 7.5 mg/kg cada 6 horas mg/kg, registrando el final de la primera administración como tiempo 0.

Los DIS fueron extraídos asépticamente de cada conejo bajo sedación y anestesia local a las 3, 6, 9, 12, 18 y 24 horas post-administración, recuperándose el contenido para el conteo bacteriano. Simultáneamente, se extrajo 1 ml de sangre para el dosaje de las concentraciones de ciprofloxacina.

Las concentraciones de ciprofloxacina en las muestras sanguíneas obtenidas fueron cuantificadas por método microbiológico utilizando *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 como microorganismo test.

4.3) Descripción de la disposición plasmática de ciprofloxacina tras su administración intramuscular a dosis única de 30 mg/kg.

4.3.a) Preparación de los dispositivos de implantación subcutánea (DIS):

Idem al estudio 3.1.a

4.3.b) Implantación subcutánea del DIS:

Idem al estudio 3.1.b

4.3.c) Tratamiento antibiótico y toma de muestras:

El procedimiento fue el mismo que en el estudio 4.1.c, la única diferencia fue la vía de administración de la ciprofloxacina, siendo en este caso la vía intramuscular.

4.4) Descripción de la disposición plasmática de ciprofloxacina tras su administración intramuscular a dosis de 7.5 mg/kg/6h durante un período de 24 horas

4.4.a) Preparación de los dispositivos de implantación subcutánea (DIS):

Idem al estudio 3.1.a

4.4.b) Implantación subcutánea del DIS:

Idem al estudio 3.1.b

4.4.c) Tratamiento antibiótico y toma de muestras:

El procedimiento fue el mismo que en el estudio 4.2.c, la única diferencia fue la vía de administración de la ciprofloxacina, siendo en este caso la vía intramuscular.

5.- Integración cinético/dinámica a los datos obtenidos en los estudios realizados con cefalexina y ciprofloxacina e identificación de la correlación entre los diferentes parámetros farmacocinéticos y las curvas de muerte bacteriana.

Análisis farmacocinético

Discriminación del modelo farmacocinético

La discriminación del modelo farmacocinético con mejor ajuste a las curvas de disposición plasmática de cefalexina y ciprofloxacina fue realizado aplicando los Criterios de Información de Schwartz y Akaike (AIC) y su aplicación para la discriminación de modelos farmacocinéticos reportada por Yamaoka, conformando el test MAICE (Minimum Akaike Information Criterion estimation). (Schwartz, 1978) (Akaike 1974) (Yamaoka y col., 1978)

El criterio Akaike es definido por la siguiente expresión:

$$AIC = N \ln R_e + 2p$$

Donde, N es el número de observaciones, P es el número de parámetros, Re es la suma del cuadrado de las residuales entre concentraciones experimentales y estimadas, expresado como:

$$R_e = \sum_{i=1}^n W_i (C_{est} - C_{obs})^2$$

Donde, C_{est} es la concentración estimada, C_{obs} es la concentración observada y W_i es el factor de ponderación de cada observación.

La estimación de los parámetros cinéticos, concentraciones teóricas y la suma de cuadrados residual de acuerdo a los diferentes modelos fue realizada por regresión no lineal utilizando las ecuaciones diferenciales propias de cada modelo y

el algoritmo Gauss-Newton con la modificación de Levenberg y Hartley (Hartley, 1961)

Cálculo de los parámetros farmacocinéticos

La curva de disposición plasmática expresa la declinación de las concentraciones de fármacos como función del tiempo.

Luego de una administración endovenosa las concentraciones plasmáticas pueden ser descritas matemáticamente a través de la siguiente ecuación poliexponencial:

$$C(t) = \sum Y_i \exp(-\lambda_i t)$$

Donde $C(t)$ es la concentración plasmática a tiempo t , Y ($\mu\text{g/ml}$) es el coeficiente al término $i^{\text{º}}$ y λ_i (1/h) es el exponente.

Para las administraciones intravenosas se seleccionó un modelo monoexponencial de acuerdo a un modelo abierto de un compartimiento

$$C(t) = Y \exp(-\lambda t)$$

Donde $C(t)$ ($\mu\text{g/ml}$) representa la concentración plasmática del antimicrobiano a tiempo t ; Y ($\mu\text{g/ml}$) es la concentración extrapolada a tiempo 0 y λ (1/h) es la pendiente de la fase de eliminación.

Las curvas de disposición plasmática obtenidas tras la administración extravascular en monodosis fueron analizadas siguiendo un procedimiento similar al utilizado en los ensayos intravenosos.

Luego de aplicar los criterios mencionados, el modelo que mejor ajustó a las curvas de disposición plasmática fue biexponencial sin T_{lag} que describe un modelo monocompartimental abierto:

$$C_{(t)} = FD / V_d [(\lambda_1 / (\lambda_1 - \lambda_2)) [\exp(-\lambda_2 t) - \exp(-\lambda_1 t)]]$$

Donde, $C_{(t)}$ es la concentración plasmática en el tiempo t ; FD es la dosis corregida por la biodisponibilidad; V_d es el volumen de distribución; λ_1 y λ_2 son las constantes de primer orden de las fases inicial (absorción) y terminal (eliminación).

Para las administraciones extravasculares multidosis se consideró una sola constante de disposición plasmática, que representa la constante de tasa de absorción y la constante de tasa de eliminación como una variable única. El modelo bi-exponencial para una administración con absorción de 1er orden es representado a través de la siguiente expresión:

$$C_p = \frac{K_a F D}{V(K_a - K_{el})} e^{-K_{el} t} - e^{-K_a t}$$

Esta ecuación bi-exponencial es válida siempre que las diferencias entre la constante de tasa de eliminación y absorción mantengan una proporción. Cuando el proceso de absorción es extremadamente rápido comparado con el de eliminación ($K_a \gg K_{el}$) $e^{-K_a t}$ se aproxima a cero (Gunaratna, 2001), por lo tanto la ecuación original que describe el proceso se transforma en:

$$C_p = \frac{K_a F D}{V(K_a - K_{el})} e^{-k_{el} t}$$

La mayoría de los parámetros cinéticos fueron calculados usando ecuaciones clásicas asociadas al análisis farmacocinético compartimental (Gibaldi, 1982).

Las vidas medias de absorción ($t_{1/2 \text{ abs}}$) y eliminación ($t_{1/2 \text{ el}}$) fueron calculadas de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$T_{1/2 \text{ abs o el}} = 0.693 / K_{ab \text{ o } K_{el}}$$

El área bajo la curva concentración plasmática vs tiempo ($AUC_{(0 - \infty)}$) y el tiempo medio de residencia (MRT) fueron calculados aplicando la regla de los trapecoides con extrapolación al infinito. El área de extrapolación fue estimada de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$AUC_{(last-\infty)} = C_{last} / K_{el}$$

Donde C_{last} es la última concentración medida.

El clearance corporal (CIB) fue estimado aplicando la siguiente ecuación:

$$CIB = \text{Dosis} \times F / AUC_{(0 - \infty)}$$

y el volumen de distribución en estado estacionario:

$$Vd_{(ss)} = CIB \times MRT$$

III - RESULTADOS

Los resultados se detallarán para cada una de las etapas descritas anteriormente:

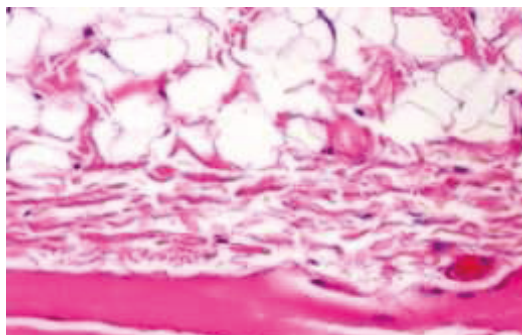
ETAPA 1

Diseño y evaluación de la inocuidad y aplicabilidad de un dispositivo de implantación subcutánea (DIS) que permita el análisis *in vivo* del crecimiento bacteriano. Esta etapa incluyó los siguientes estudios.

1.1) Estudio de inocuidad del DIS:

Los análisis físico-químicos de los DIS conteniendo solución fisiológica y caldo cerebro corazón arrojaron valores comprendidos dentro del rango de parámetros normales para ambos líquidos. En los estudios microbiológicos no se observó desarrollo bacteriano, lo que demuestra la esterilidad del dispositivo.

Los estudios histopatológicos (ver foto) indicaron la ausencia de respuesta tisular a la presencia del dispositivo.



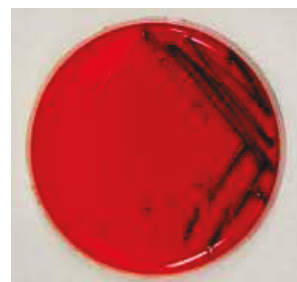
FOTOGRAFIA CORTE HISTOLOGICO DE ZONA DE IMPLANTACION (20 X)

1.2) Estudio comparativo del crecimiento bacteriano en dispositivos implantados subcutáneamente en conejos y cultivados en estufa de cultivo a 37 °C:

Como se observa en la foto, no se detectó el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922 en las placas de agar sangre sembradas con los hisopados de los bolsillos subcutáneos. Esto indica el correcto cierre de los dispositivos con poliacrilamida reforzado con polipropileno.



HISOPADO CONEJO 2



CONTROL POSITIVO

Los resultados de los conteos bacterianos en el interior de los DIS implantados en conejos y los cultivados en estufa se muestran a continuación (Tabla 1a implantados en conejo, Tabla 1b incubados en estufa a 37°C) :

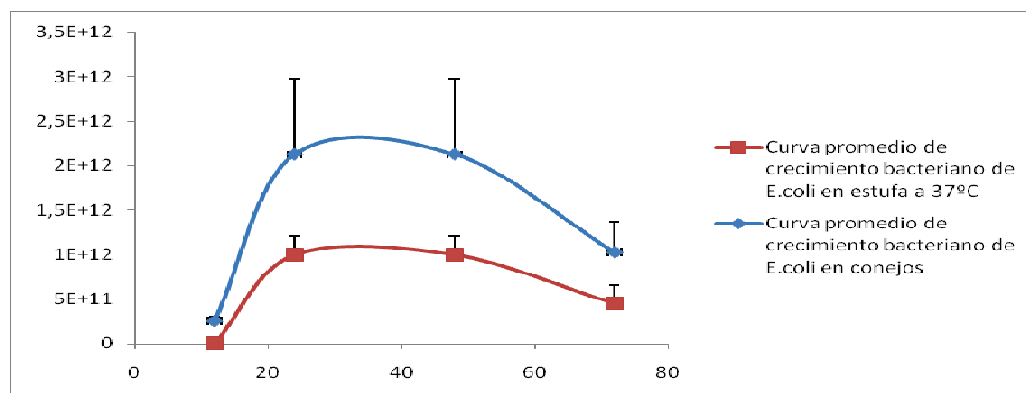
Tabla 1a: Unidades formadoras de colonia (UFC) de *Escherichia coli* ATCC 25922 correspondiente a los DIS implantados en conejos.

| Tiempo | Conejo 1 | Conejo 2 | Conejo 3 | Conejo 4 | Promedio | DE |
|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 12 | 3,00E+11 | 2,00E+11 | 2,50E+11 | 2,80E+11 | 2,58E+11 | 4,35E+10 |
| 24 | 3,00E+12 | 1,00E+12 | 1,50E+12 | 2,50E+12 | 2,00E+12 | 9,13E+11 |
| 48 | 3,00E+12 | 1,00E+12 | 2,50E+12 | 1,40E+12 | 1,98E+12 | 9,32E+11 |
| 72 | 2,00E+08 | 3,00E+09 | 7,00E+08 | 2,00E+09 | 1,48E+09 | 1,27E+09 |

Tabla 1b: Unidades formadoras de colonia (UFC) de *Escherichia coli* ATCC 25922 correspondiente a los DIS cultivados en estufa.

| Tiempo | Tubo 1 | Tubo 2 | Tubo 3 | Tubo 4 | Promedio | DE |
|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 12 | 4,00E+08 | 5,00E+08 | 7,50E+08 | 9,00E+07 | 4,35E+08 | 2,73E+08 |
| 24 | 2,00E+10 | 1,50E+10 | 8,50E+09 | 3,00E+10 | 1,84E+10 | 9,06E+09 |
| 48 | 2,00E+10 | 5,00E+10 | 7,00E+09 | 1,00E+10 | 2,18E+10 | 1,96E+10 |
| 72 | 1,00E+06 | 9,80E+05 | 2,00E+06 | 7,00E+05 | 1,17E+06 | 5,70E+05 |

Las curvas promedio de crecimiento bacteriano en función del tiempo de los dispositivos implantados en conejos y aquellos incubados en estufa a 37 °C se presentan a continuación:



Las curvas de crecimiento bacteriano vs tiempo mostraron la forma clásica y esperable para *Escherichia coli* ATCC 25922, con una fase exponencial (entre las 0 y 24 hs), otra de meseta (entre las 24 y 48 hs) y otra de muerte bacteriana (entre las 48 y 72 hs). El pico máximo de crecimiento se observó a las 24 h tanto en el inóculo obtenido de los DIS implantados como los incubados en estufa a 37°C.

La comparación estadística de las curvas, no mostró diferencias significativas. Cabe aclarar que las diferencias numéricas (menores a 1 log) son esperables ya que un organismo vivo ofrece mejores condiciones para la multiplicación bacteriana que una estufa de cultivo a 37°C.

ETAPA 2

Puesta a punto de los métodos analíticos

2.1) Puesta a punto del método microbiológico para el dosaje de cefalexina en plasma.

Las curvas estándar utilizadas cumplieron todos los requisitos de validación.

Los resultados de los análisis de precisión evaluados a través de los coeficientes de variación intra e interdía se presentan en las tablas 2.1.a y 2.1.b. Los resultados del análisis de exactitud se presentan en la tabla 2.1.c.

Los coeficientes de variación intra e inter-día fueron siempre menores a 15% (20% LOQ) . De acuerdo a los criterios de validación planteados, el análisis de exactitud para cefalexina mostró que los valores estimados fueron, en todos los casos, equivalentes a los valores observados.

Según los criterios de validación planteados se fijó un límite de cuantificación (LOQ) de 0,78 µg/ml y de detección (LD) de 0,39 µg/ml.

Las curvas de regresión para cefalexina correspondientes a la variación interdía, intradía y de calibración se presentan en las figuras A, B y C, respectivamente.

Tabla 2.1.a: Resultados del análisis de la precisión del método microbiológico para la determinación de las concentraciones plasmáticas de cefalexina. Variación intra-día.

| Concentración (µg/ml) | Placa 1 | Placa 2 | Placa 3 | MEDIA | DE | CV |
|-----------------------|---------|---------|---------|-------|------|-------|
| 25 | 3,5 | 3,8 | 3,7 | 3,67 | 0,15 | 4,17 |
| 12,5 | 3,2 | 3,5 | 3,4 | 3,37 | 0,15 | 4,54 |
| 6,25 | 3 | 3,1 | 3,2 | 3,10 | 0,10 | 3,23 |
| 3,13 | 2,8 | 2,8 | 2,8 | 2,80 | 0,00 | 0,00 |
| 1,56 | 2,4 | 2,4 | 2,3 | 2,37 | 0,06 | 2,44 |
| 0,78 | 2 | 2 | 1,7 | 1,90 | 0,17 | 9,12 |
| 0,39 | 1,5 | 1,2 | 1,4 | 1,37 | 0,15 | 11,18 |

Tabla 2.1.b: Resultados del análisis de la precisión del método microbiológico para la determinación de las concentraciones plasmáticas de cefalexina. Variación inter-día.

| Concentración (µg/ml) | Día 1 | Día 2 | Día 3 | MEDIA | DE | CV |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|------|-------|
| 25 | 3,7 | 4,1 | 3,65 | 3,82 | 0,25 | 6,46 |
| 12,5 | 3,5 | 3,85 | 3,35 | 3,57 | 0,26 | 7,19 |
| 6,25 | 3,1 | 3,55 | 3,05 | 3,23 | 0,28 | 8,52 |
| 3,13 | 2,75 | 3,1 | 2,8 | 2,88 | 0,19 | 6,57 |
| 1,56 | 2,4 | 2,65 | 2,4 | 2,48 | 0,14 | 5,81 |
| 0,78 | 2 | 2,15 | 2 | 2,05 | 0,09 | 4,22 |
| 0,39 | 1,55 | 1,65 | 1,35 | 1,52 | 0,15 | 10,07 |

Tabla 2.1.c: Resultados del análisis de la exactitud del método microbiológico para la determinación de las concentraciones plasmáticas de cefalexina.

| Concentración ($\mu\text{g/ml}$) | Exactitud (%): (valor estimado/valor observado).100 | | |
|------------------------------------|---|--------|--------|
| | Día 1 | Día 2 | Día 3 |
| 25 | 99,88 | 115,77 | 110,50 |
| 12,5 | 95,39 | 93,35 | 108,51 |
| 6,25 | 95,85 | 97,93 | 94,28 |
| 3,13 | 98,28 | 92,23 | 94,41 |
| 1,56 | 90,84 | 90,84 | 99,46 |
| 0,78 | 104,17 | 107,02 | 98,89 |
| 0,39 | 110,00 | 118,81 | 115,48 |

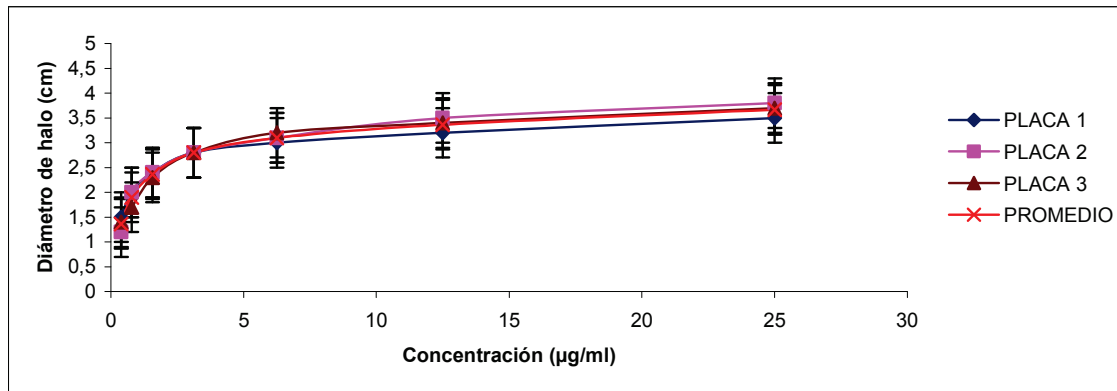


Figura A. Puesta a punto del método microbiológico para el dosaje de cefalexina en plasma de conejo. VARIACIÓN INTRADÍA.

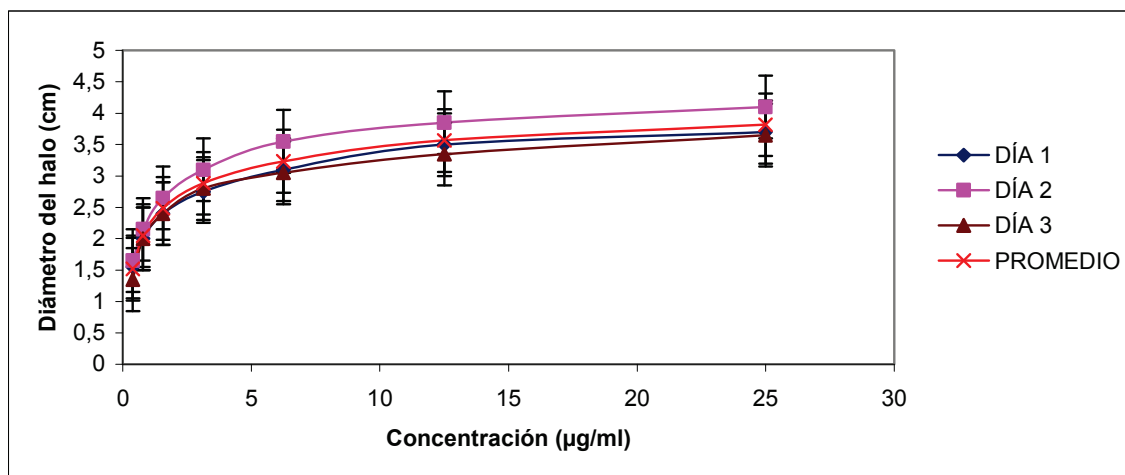


Figura B. Puesta a punto del método microbiológico para el dosaje de cefalexina en plasma de conejo. VARIACIÓN INTERDÍA.

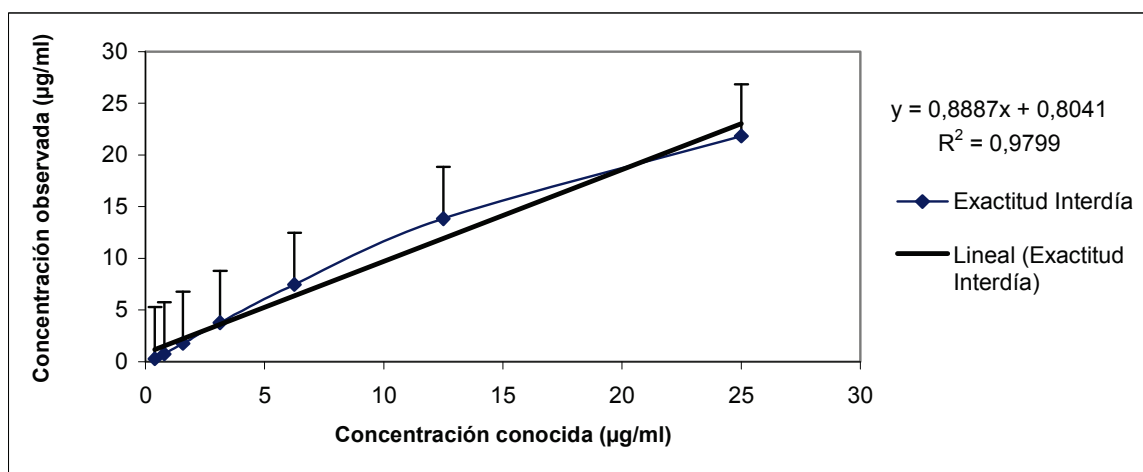


Figura C. Puesta a punto del método microbiológico para el dosaje de cefalexina en plasma de conejo. EXACTITUD INTERDÍA.

2.2) Puesta a punto del método microbiológico para el dosaje de ciprofloxacina en plasma

Las curvas estándar utilizadas cumplieron todos los requisitos de validación.

Los resultados de los análisis de precisión evaluados a través de los coeficientes de variación intra e interdía se presentan en las tablas 2.2.a y 2.2.b. Los resultados del análisis de exactitud se presentan en la tabla 2.2.c.

Los coeficientes de variación intra e inter-día fueron siempre menores a 15%. De acuerdo a los criterios de validación planteados, el análisis de exactitud para ciprofloxacina mostró que los valores estimados fueron, en todos los casos, equivalentes a los valores observados.

Según los criterios de validación planteados se fijó un límite de cuantificación (LOQ) de 0,39 µg/ml y de detección (LD) de 0,19 µg/ml.

Las curvas de regresión para ciprofloxacina correspondientes a la variación interdía, intradía y de calibración se presentan en las figuras D, E y F, respectivamente.

Tabla 2.2.a: Resultados del análisis de la precisión del método microbiológico para la determinación de las concentraciones plasmáticas de ciprofloxacina. Variación intra-día.

| Concentración (µg/ml) | Placa 1 | Placa 2 | Placa 3 | MEDIA | DE | CV |
|-----------------------|---------|---------|---------|-------|------|-------|
| 25 | 4,4 | 3,8 | 3,9 | 4,03 | 0,32 | 7,97 |
| 12,5 | 4 | 3,5 | 3,7 | 3,73 | 0,25 | 6,74 |
| 6,25 | 3,55 | 3,5 | 3,5 | 3,52 | 0,03 | 0,82 |
| 3,12 | 3,3 | 3,2 | 3,1 | 3,20 | 0,10 | 3,13 |
| 1,5 | 2,9 | 2,8 | 2,7 | 2,80 | 0,10 | 3,57 |
| 0,78 | 2,4 | 2,3 | 2 | 2,23 | 0,21 | 9,32 |
| 0,39 | 2,2 | 2 | 1,8 | 2,00 | 0,20 | 10,00 |
| 0,19 | 1,8 | 1,7 | 1,6 | 1,70 | 0,10 | 5,88 |

Tabla 2.2.b: Resultados del análisis de la precisión del método microbiológico para la determinación de las concentraciones plasmáticas de ciprofloxacina. Variación inter-día.

| Concentración (µg/ml) | Día 1 | Día 2 | Día 3 | MEDIA | DE | CV |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|------|-------|
| 25 | 4,10 | 4,85 | 3,80 | 4,25 | 0,54 | 12,73 |
| 12,5 | 3,75 | 4,55 | 3,60 | 3,97 | 0,51 | 12,88 |
| 6,25 | 3,53 | 4,30 | 3,35 | 3,73 | 0,51 | 13,57 |
| 3,12 | 3,25 | 3,80 | 3,00 | 3,35 | 0,41 | 12,22 |
| 1,5 | 2,85 | 3,50 | 2,65 | 3,00 | 0,44 | 14,81 |
| 0,78 | 2,35 | 2,80 | 2,20 | 2,45 | 0,31 | 12,74 |
| 0,39 | 2,10 | 2,30 | 1,75 | 2,05 | 0,28 | 13,58 |
| 0,19 | 1,75 | 1,70 | 1,40 | 1,62 | 0,19 | 11,71 |

Tabla 2.2.c: Resultados del análisis de la exactitud del método microbiológico para la determinación de las concentraciones plasmáticas de ciprofloxacina.

| Concentración ($\mu\text{g/ml}$) | Exactitud (%): (valor estimado/valor observado).100 | | |
|------------------------------------|---|-------|-------|
| | Día 1 | Día 2 | Día 3 |
| 25 | 96,31 | 91,40 | 99,77 |
| 12,5 | 88,26 | 96,78 | 98,42 |
| 6,25 | 101,1 | 109,0 | 106,6 |
| 3,12 | 109,6 | 110,7 | 108,8 |
| 1,5 | 110,5 | 100,1 | 109,2 |
| 0,78 | 111,7 | 101,9 | 93,36 |
| 0,39 | 99,22 | 93,56 | 100,5 |
| 0,19 | 98,05 | 97,62 | 99,84 |

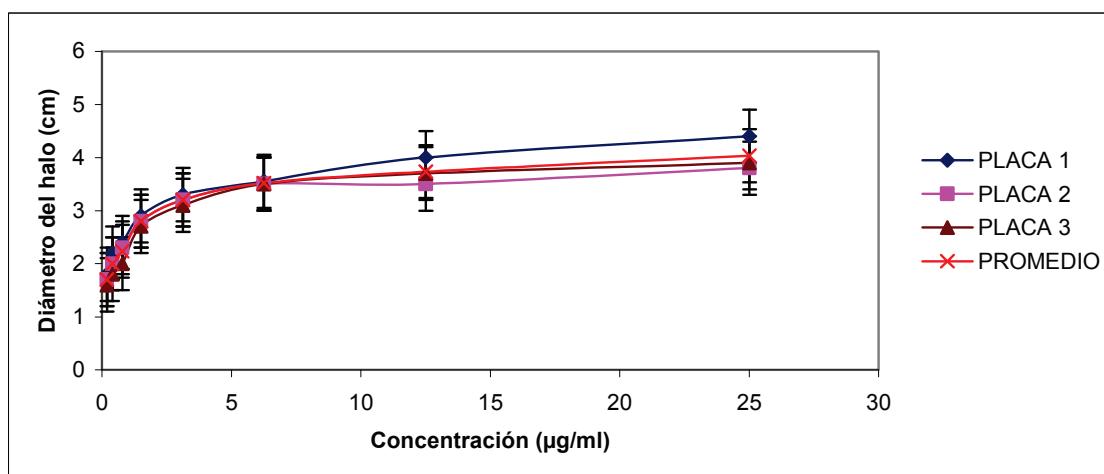


Figura D. Puesta a punto del método microbiológico para el dosaje de ciprofloxacina en plasma de conejo. VARIACIÓN INTRADÍA.

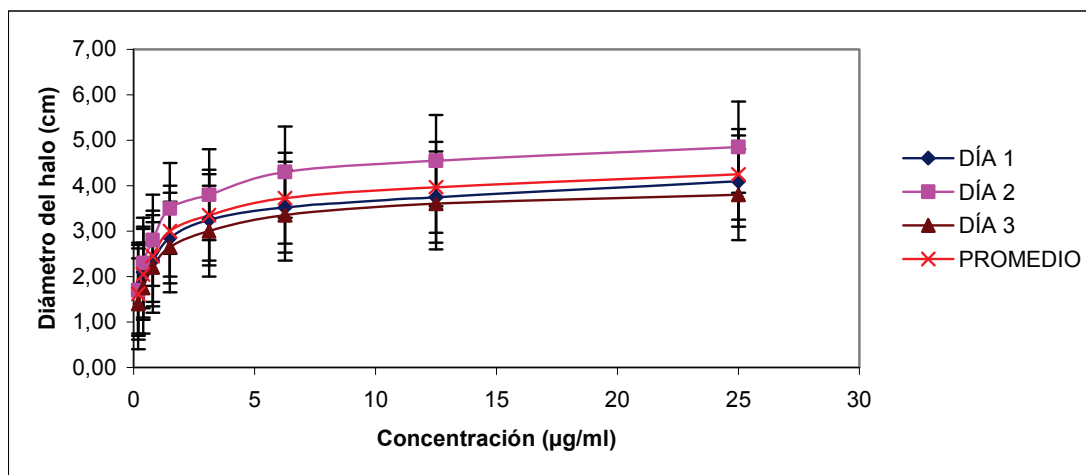


Figura E. Puesta a punto del método microbiológico para el dosaje de ciprofloxacina en plasma de conejo. VARIACIÓN INTERDÍA.

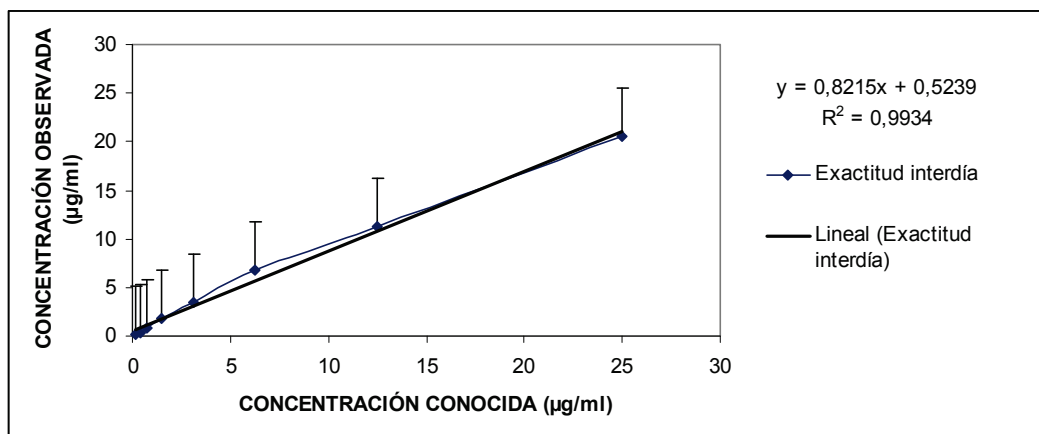


Figura F. Puesta a punto del método microbiológico para el dosaje de ciprofloxacina a en plasma de conejo. EXACTITUD INTERDÍA.

ETAPA 3

Validación del modelo desarrollado a través del análisis de la curva de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente en conejos tratados con cefalexina, como representante del grupo de antimicrobianos con cinética de killing bacteriano tiempo dependiente.

3.1) Estudio de las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente, disposición plasmática y análisis cinético de cefalexina tras su administración intravenosa a dosis única de 10 mg/kg.

La concentración bacteriana de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en animales control se presenta en la Tabla 3.1a. Mientras que la misma variable conjuntamente con la concentración plasmática de cefalexina en el grupo tratado se presenta en la tabla 3.1b.

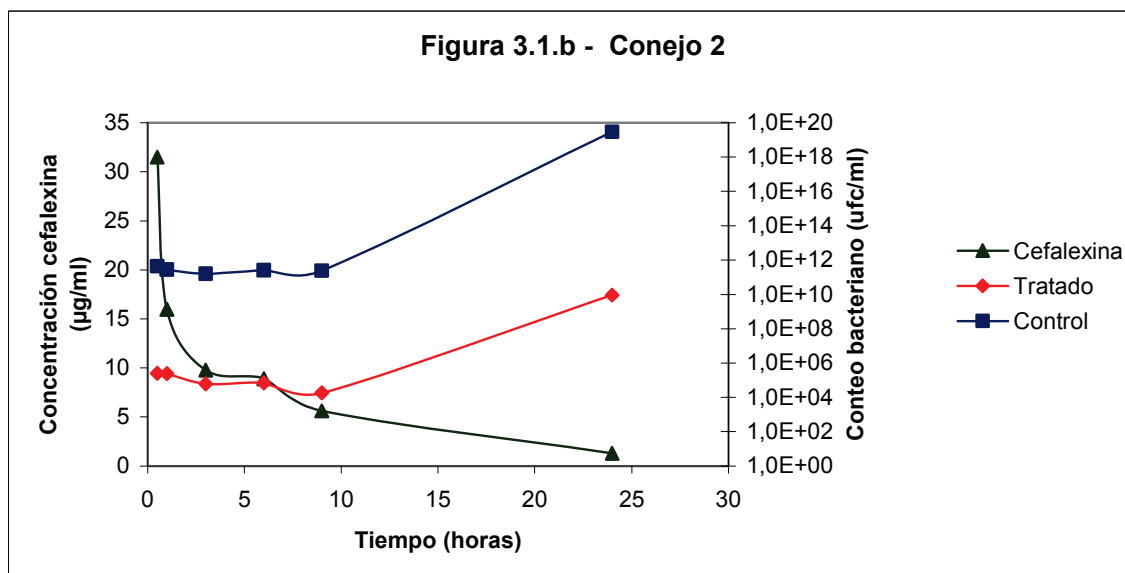
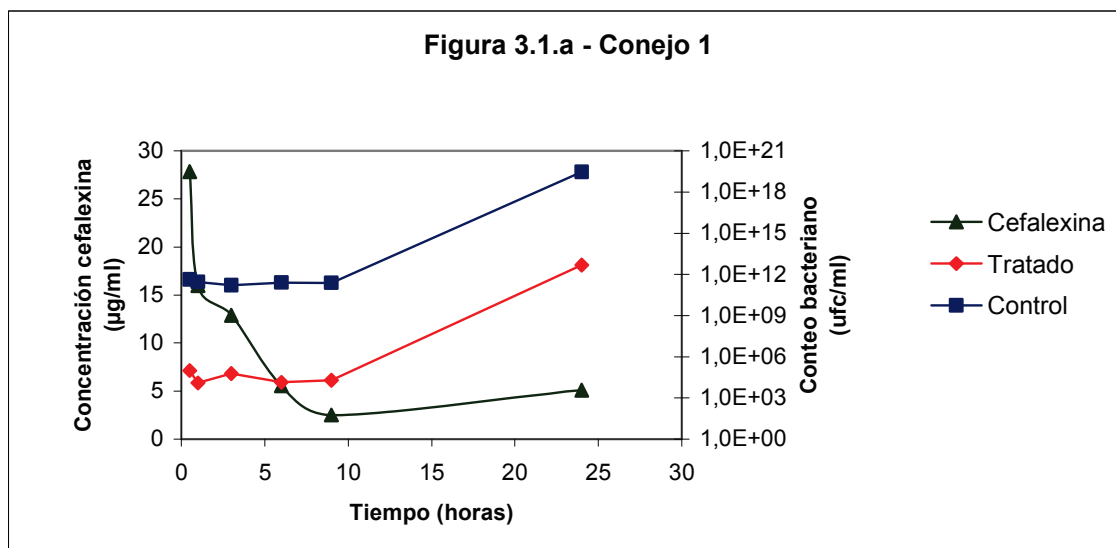
Las curvas de disposición plasmática de cefalexina tras su administración intravenosa a la dosis de 10 mg/kg conjuntamente con las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los DIS se presentan en las figuras 3.1.a; 1.b; 1.c y 1.d.

Tabla 3.1.a: Conteos bacterianos de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en los DIS sin la cefalexina a la dosis de 10 mg/Kg (controles).

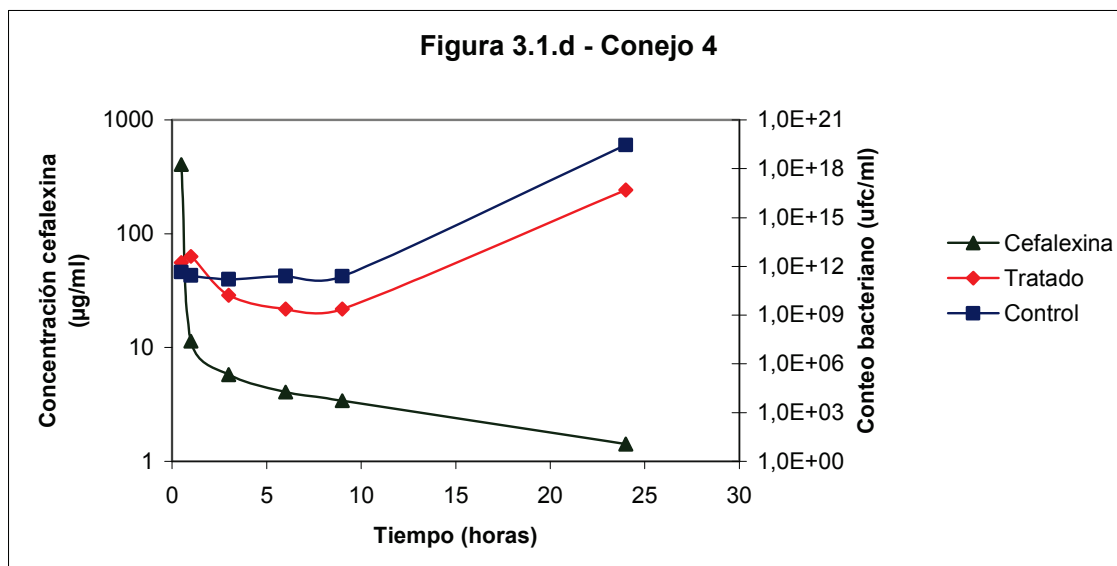
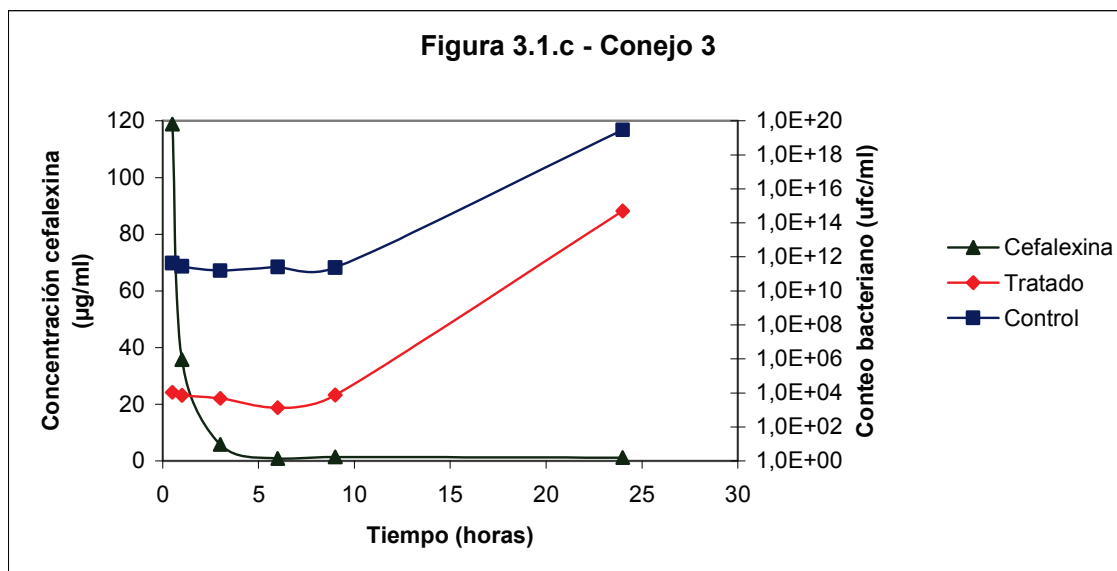
| Tiempo | Conejo 1 | Conejo 2 | Conejo 3 | Conejo 4 | Promedio | DE | E |
|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|------|
| 0,5 | 1,07E+10 | 8,00E+11 | 3,00E+10 | 9,00E+11 | 4,35E+11 | 4,81E+11 | 2,40 |
| 1 | 1,25E+10 | 9,40E+11 | 1,00E+11 | 7,00E+10 | 2,81E+11 | 4,41E+11 | 2,21 |
| 3 | 3,14E+10 | 2,54E+11 | 5,00E+10 | 3,00E+11 | 1,59E+11 | 1,38E+11 | 6,90 |
| 6 | 4,10E+10 | 8,40E+11 | 6,00E+10 | 8,00E+10 | 2,55E+11 | 3,90E+11 | 1,95 |
| 9 | 1,34E+11 | 1,74E+11 | 4,00E+11 | 2,50E+11 | 2,40E+11 | 1,17E+11 | 5,87 |
| 24 | 2,42E+18 | 6,70E+19 | 8,40E+18 | 4,00E+19 | 2,95E+19 | 3,00E+19 | 1,50 |

Tabla 3.1.bConcentración plasmática de cefalexina con su correspondiente conteo bacteriano de 25923 en los DIS tras la administración intravenosa de cefalexina a la dosis de 10 mg/Kg

| Tiempo | Conejo 1 | | Conejo 2 | | Conejo 3 | | Conejo 4 | | Pr |
|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-------|
| | µg/ml | ufc/ml | µg/ml | ufc/ml | µg/ml | ufc/ml | µg/ml | ufc/ml | µg/ml |
| 0,5 | 27,8 | 9,80E+04 | 31,5 | 2,47E+05 | 118,8 | 1,07E+04 | 406,3 | 1,7E+12 | 146,1 |
| 1 | 16,0 | 1,24E+04 | 16,0 | 2,40E+05 | 35,7 | 7,30E+03 | 11,4 | 4,05E+12 | 19,8 |
| 3 | 12,9 | 6,00E+04 | 9,8 | 6,10E+04 | 5,8 | 4,80E+03 | 5,8 | 1,68E+10 | 8,6 |
| 6 | 5,6 | 1,40E+04 | 8,9 | 6,90E+04 | 0,8 | 1,34E+03 | 4,1 | 2,36E+09 | 4,8 |
| 9 | 2,5 | 1,96E+04 | 5,6 | 1,80E+04 | 1,3 | 7,50E+03 | 3,4 | 2,31E+09 | 3,2 |
| 24 | 5,1 | 4,85E+12 | 1,3 | 9,00E+09 | 1,1 | 5,00E+14 | 1,4 | 5,00E+16 | 2,2 |



Figuras 3.1.a y 1.b correspondientes a curvas del crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en animales tratados, no tratados y concentración plasmática de cefalexina tras la administración de un bolo intramuscular de 10 mg/kg en función del tiempo.



Figuras 3.1.c y 1.d correspondientes a curvas del crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en animales tratados, no tratados y concentración plasmática de cefalexina tras la administración de un bolo intramuscular de 10 mg/kg en función del tiempo.

Las curvas concentración plasmática de cefalexina en función del tiempo para la administración intravenosa a dosis única en todos los animales experimentales se ajustaron a un modelo abierto monocompartimental , siendo la ecuación promedio para los cuatro animales experimentales:

$$C_p(t) = 108.67 e^{-0.95t}$$

Los parámetros cinéticos para los 4 animales experimentales así como los valores promedio (\pm DE y ES) se presentan a continuación:

| Parámetro | Conejo 1 | Conejo 2 | Conejo 3 | Conejo 4 | Promedio | DE | Error |
|---|----------|----------|----------|----------|----------|--------|-------|
| Kel (1/h) | 0,36 | 0,34 | 1,63 | 1,48 | 0,95 | 0,70 | 0,35 |
| AUC($\mu\text{g}/\text{h}/\text{ml}$) | 98,06 | 107,99 | 144,99 | 94,77 | 111,45 | 23,05 | 11,53 |
| T1/2 el (h) | 2,44 | 2,57 | 0,42 | 0,47 | 1,48 | 1,19 | 0,60 |
| C0 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | 27,85 | 29,14 | 236,78 | 140,90 | 108,67 | 100,51 | 50,26 |
| Cl (ml/kg/h) | 0,10 | 0,09 | 0,07 | 0,11 | 0,09 | 0,02 | 0,01 |
| AUMC | 345,28 | 400,22 | 88,78 | 63,74 | 224,50 | 172,94 | 86,47 |
| MRT (h) | 3,52 | 3,71 | 0,61 | 0,67 | 2,13 | 1,72 | 0,86 |
| Vss (l/kg) | 0,36 | 0,34 | 0,04 | 0,07 | 0,20 | 0,17 | 0,09 |

Tras la administración intravenosa en forma de bolo único, cefalexina mostró una vida media aproximadamente de 1.5 h (esperable para un betalactámico) con un bajo volumen de distribución; es importante remarcar la variación inter-animal en este parámetro, la cual estaría reflejando dos poblaciones claramente diferenciadas. El clearance arrojó un valor intermedio con baja variabilidad inter-animal. La concentración máxima estimada (C_0), al igual que el volumen de distribución muestra una distribución entre los animales experimentales del tipo bi-modal.

3.2) Estudio de las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente, disposición plasmática y análisis cinético de cefalexina tras su administración intravenosa a la dosis de 2.5 mg/kg/6h durante un período de 24 horas

La concentración bacteriana de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en animales control se presenta en la Tabla 3.2.a. Mientras que la misma variable conjuntamente con la concentración plasmática de cefalexina en el grupo tratado se presenta en la tabla 3.2.b.

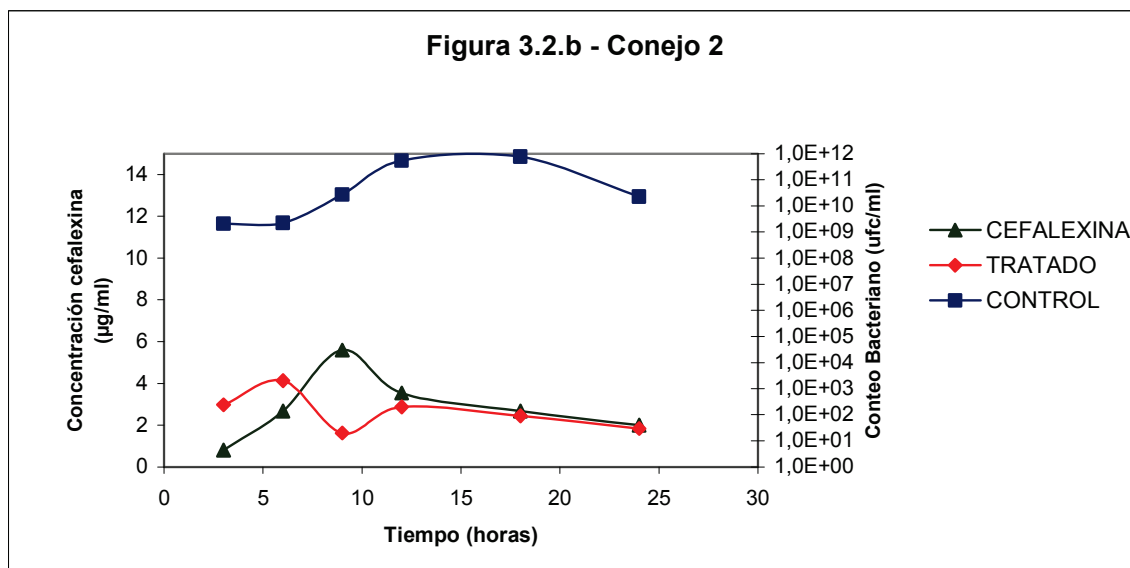
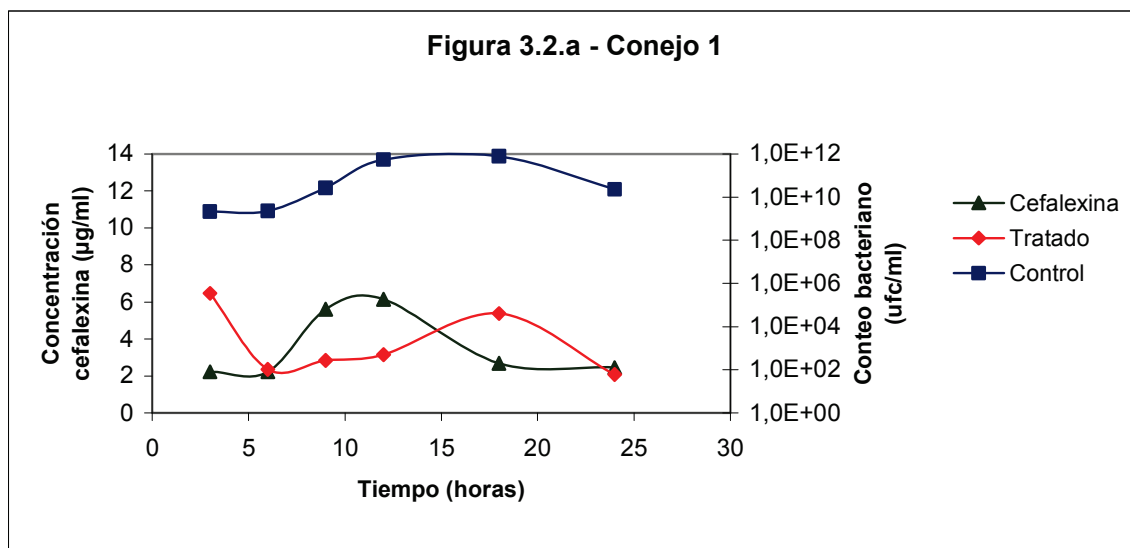
Las curvas de disposición plasmática de cefalexina tras su administración intravenosa a la dosis de 2.5 mg/kg/6h, por un periodo de 24 horas, conjuntamente con las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los DIS se presentan en las Figuras 3.2.a; 2.b; 2.c y 2.d

Tabla 3.2.a: Conteos bacterianos de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en los DIS sin la cefalexina a la dosis de 2.5 mg/kg/6h durante un período de 24 horas (controles).

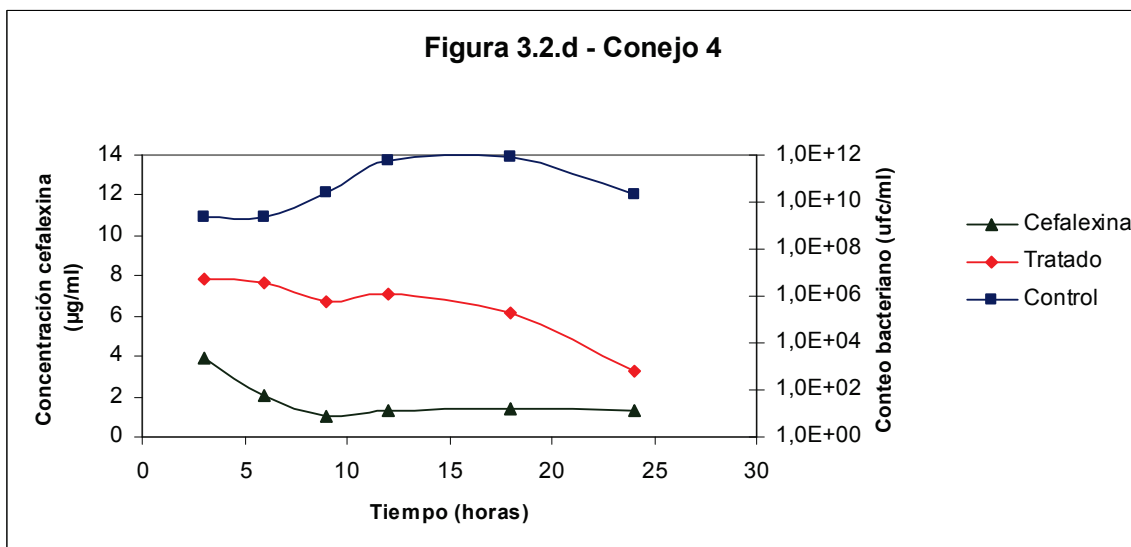
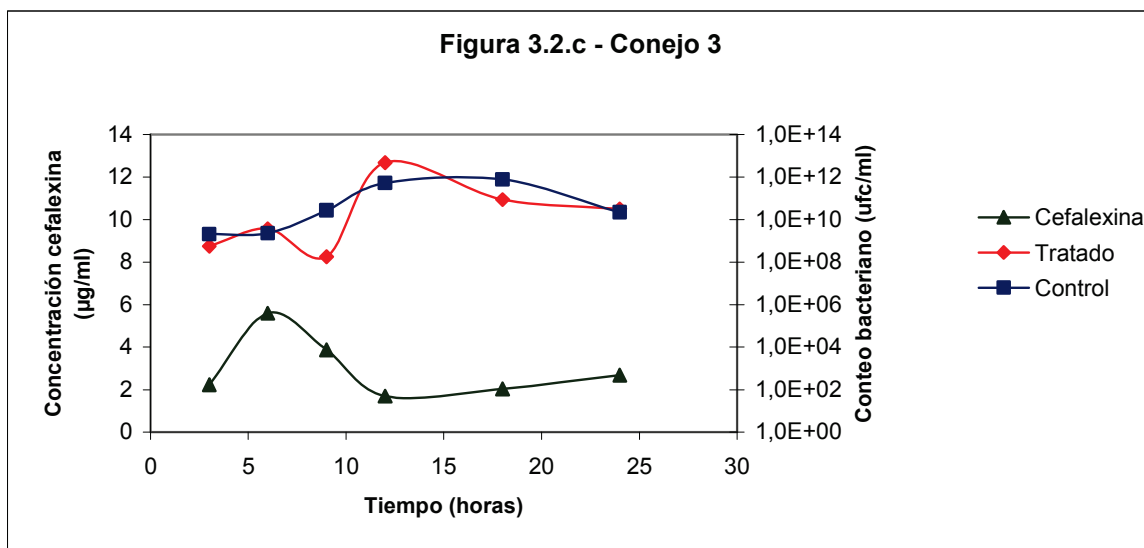
| Tiempo | Conejo 1 | Conejo 2 | Conejo 3 | Conejo 4 | Promedio | DE | E |
|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 3 | 1,32E+09 | 1,47E+09 | 2,50E+09 | 3,10E+09 | 2,10E+09 | 8,50E+08 | 4,29E+08 |
| 6 | 1,83E+09 | 1,52E+09 | 1,72E+09 | 4,00E+09 | 2,27E+09 | 1,16E+09 | 5,81E+08 |
| 9 | 2,40E+10 | 3,40E+10 | 3,15E+10 | 1,87E+10 | 2,71E+10 | 7,00E+09 | 3,50E+09 |
| 12 | 9,00E+11 | 1,71E+10 | 5,00E+11 | 7,30E+11 | 5,37E+11 | 3,83E+11 | 1,92E+11 |
| 18 | 8,10E+11 | 7,00E+11 | 6,46E+11 | 9,52E+11 | 7,77E+11 | 1,35E+11 | 6,76E+10 |
| 24 | 1,45E+10 | 1,30E+10 | 3,60E+10 | 2,70E+10 | 2,26E+10 | 1,09E+10 | 5,45E+09 |

Tabla 3.2.b Concentración plasmática de cefalexina con su correspondiente conteo bacteriano de 25923 en los DIS tras la administración intravenosa de cefalexina a la dosis de 2.5 mg/kg/6h durante

| Tiempo | Conejo 1 | | Conejo 2 | | Conejo 3 | | Conejo 4 | | Promedio |
|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | µg/ml | Ufc/ml | µg/ml | ufc/ml | µg/ml | ufc/ml | µg/ml | ufc/ml | |
| 3 | 2,23 | 5.10E+06 | 0,81 | 5.70E+08 | 2,23 | 3.50E+05 | 3,88 | 4.20E+05 | 2,29 |
| 6 | 2,23 | 3.60E+06 | 2,68 | 3.73E+09 | 5,60 | 4.00E+06 | 2,03 | 5.00E+05 | 3,14 |
| 9 | 5,60 | 5.30E+05 | 5,60 | 1.80E+08 | 3,88 | 2.70E+05 | 1,07 | 2.00E+04 | 4,04 |
| 12 | 6,14 | 1.21E+06 | 3,53 | 4.9E+12 | 1,69 | 3.20E+06 | 1,28 | 2.50E+05 | 3,16 |
| 18 | 2,68 | 1.86E+05 | 2,68 | 8.84E+10 | 2,03 | 7.40E+05 | 1,41 | 9.70E+04 | 2,20 |
| 24 | 2,45 | 640 | 2,00 | 3.24E+10 | 2,68 | 5.00E+05 | 1,28 | 3.40E+04 | 2,10 |



Figuras 3.2.a y 2.b correspondientes a curvas del crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en animales tratados, no tratados y concentración plasmática de cefalexina tras la administración intravenosa de 2.5 mg/kg/6hs en función del tiempo.



Figuras 3. 2.c y 2.d correspondientes a curvas del crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en animales tratados, no tratados y concentración plasmática de cefalexina tras la administración intravenosa de 2.5 mg/kg/6hs en función del tiempo.

Las curvas concentración plasmática de cefalexina en función del tiempo para la administración intravenosa multidosis en todos los animales experimentales se ajustaron a un modelo abierto monocompartimental , siendo la ecuación promedio para los cuatro animales experimentales:

$$C_p(t) = 10.21 e^{-0.29t}$$

Los parámetros cinéticos para los 4 animales experimentales así como los valores promedio (\pm DE y ES) se presentan a continuación:

| Parámetro | Conejo 1 | Conejo 2 | Conejo 3 | Conejo 4 | Promedio | D.E | Error |
|--------------------|----------|----------|----------|----------|----------|-------|-------|
| Kel (1/h) | 0,15 | 0,15 | 0,57 | 0,29 | 0,29 | 0,20 | 0,10 |
| AUC(μ g/h/ml) | 36,72 | 30,39 | 44,05 | 20,05 | 32,80 | 10,17 | 5,08 |
| T1/2 el (h) | 4,64 | 4,71 | 1,22 | 2,36 | 3,23 | 1,73 | 0,86 |
| C0(μ g/ml) | 5,48 | 4,47 | 25,01 | 5,89 | 10,21 | 9,88 | 4,94 |
| Cl (ml/kg/h) | 0,07 | 0,08 | 0,06 | 0,12 | 0,08 | 0,03 | 0,01 |
| AUMC | 245,87 | 206,49 | 77,61 | 68,27 | 149,56 | 90,00 | 45,00 |
| MRT (h) | 6,70 | 6,79 | 1,76 | 3,40 | 4,66 | 2,49 | 1,25 |
| Vss (l/kg) | 0,46 | 0,56 | 0,10 | 0,42 | 0,38 | 0,20 | 0,10 |

Tras la administración intravenosa en multidosis, la vida media de cefalexina fue de 3.23 h, casi dos veces la estimada para la dosis bolo, lo que refleja cierto grado de acumulación tras las cuatro administraciones. El volumen de distribución es levemente mayor al estimado para la administración en forma de bolo único, esto no se observa para el clearance; esto indica que las diferencias entre vidas medias para las dos formas de administración es reflejo de diferencias en el proceso de

distribución casi exclusivamente. Al igual que en el estudio anterior se detectaron importantes diferencias inter-animal en el volumen de distribución.

3.3) Estudio de las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente, disposición plasmática y análisis cinético de cefalexina tras su administración intramuscular a dosis única de 10 mg/kg.

La concentración bacteriana de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en animales control se presenta en la Tabla 3.3.a. Mientras que la misma variable conjuntamente con la concentración plasmática de cefalexina en el grupo tratado se presenta en la tabla 3.3.b.

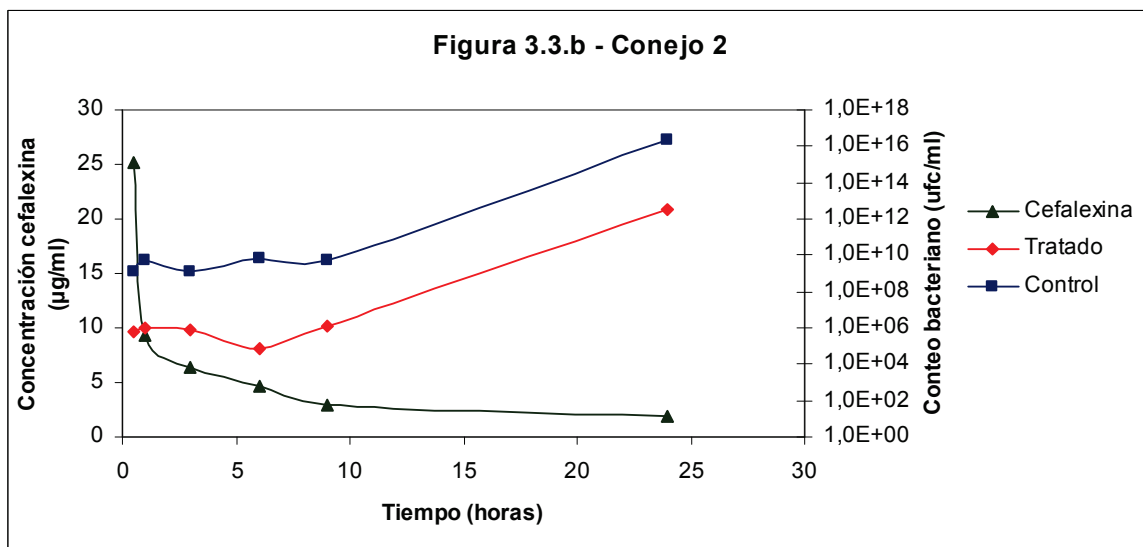
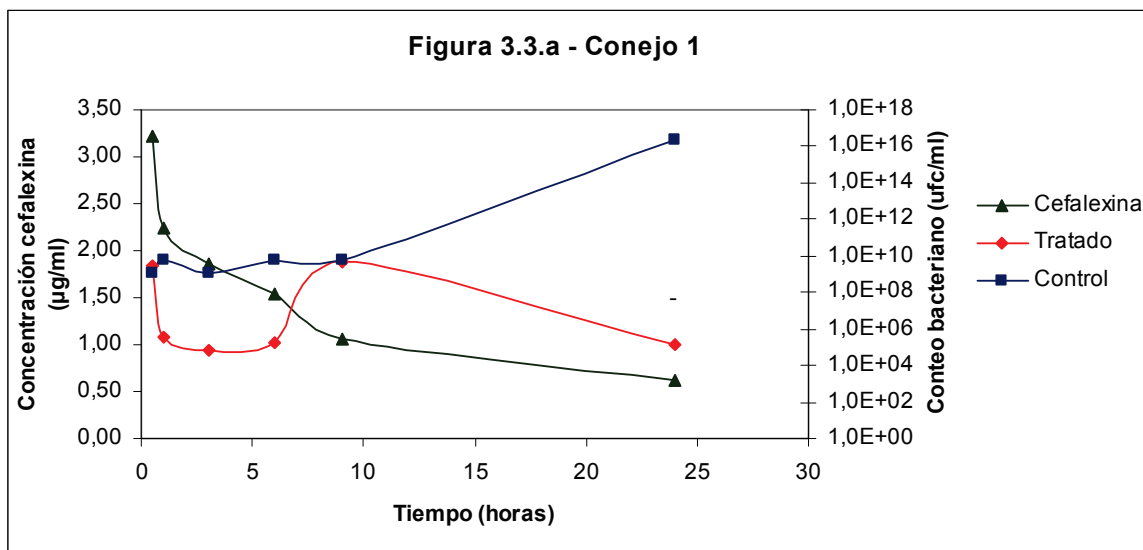
Las curvas de disposición plasmática de cefalexina tras su administración intramuscular única a la dosis de 10 mg/kg conjuntamente con las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los DIS se presentan en las figuras 3.3.a; 3.b; 3.c y 3.d

Tabla 3.3.a: Conteos bacterianos de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en los DIS sin la ad cefalexina a la dosis de 10 mg/Kg (controles).

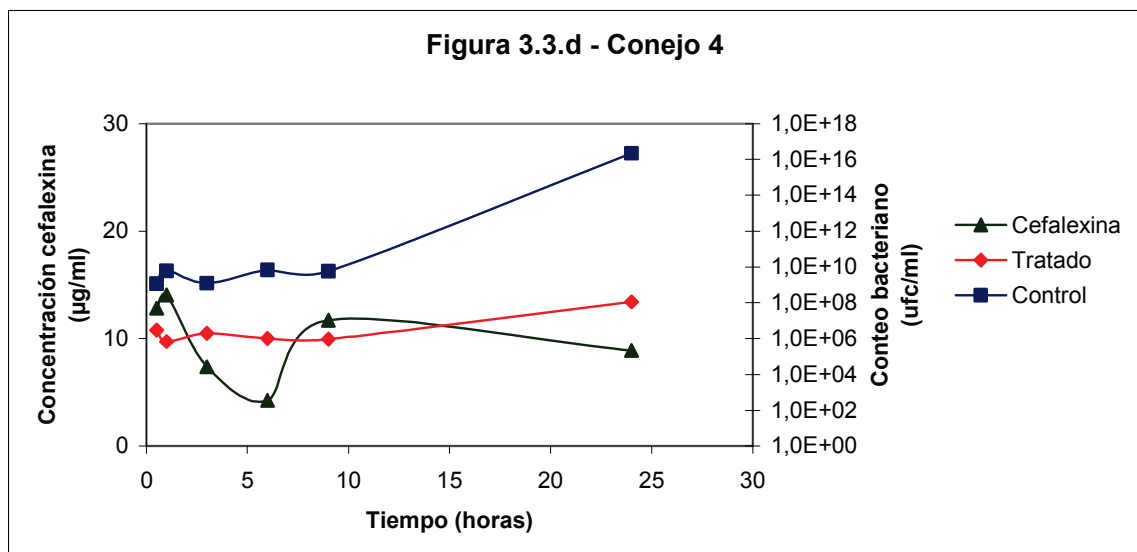
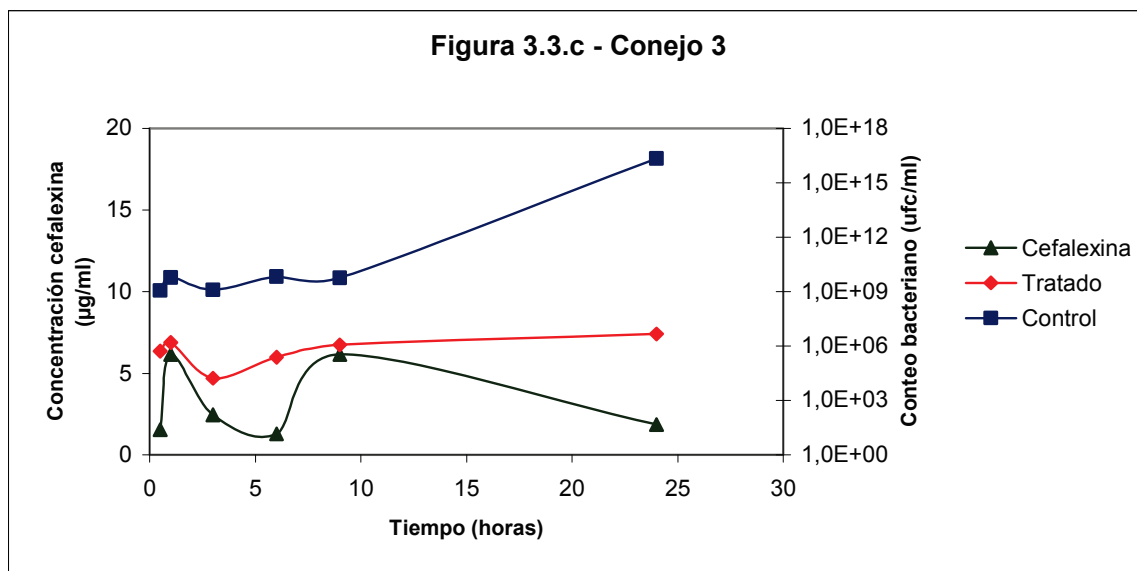
| Tiempo | Conejo 1 | Conejo 2 | Conejo 3 | Conejo 4 | Promedio | DE | E |
|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|------|
| 0,5 | 1,00E+09 | 7,80E+08 | 7,50E+08 | 2,00E+09 | 1,13E+09 | 5,89E+08 | 2,94 |
| 1 | 1,30E+09 | 9,00E+09 | 7,00E+09 | 6,40E+09 | 5,93E+09 | 3,28E+09 | 1,64 |
| 3 | 2,90E+09 | 2,70E+08 | 9,30E+08 | 7,12E+08 | 1,20E+09 | 1,16E+09 | 5,82 |
| 6 | 3,80E+09 | 8,00E+09 | 5,92E+09 | 8,43E+09 | 6,54E+09 | 2,13E+09 | 1,06 |
| 9 | 1,40E+08 | 1,67E+10 | 4,67E+08 | 5,00E+09 | 5,58E+09 | 7,74E+09 | 3,87 |
| 24 | 2,50E+16 | 7,00E+15 | 9,45E+15 | 4,73E+16 | 2,22E+16 | 1,85E+16 | 9,27 |

Tabla 3.3.b Concentración plasmática de cefalexina con su correspondiente conteo bacteriano de 25923 en los DIS tras la administración intramuscular de cefalexina a la dosis de 10 mg/Kg.

| Tiempo | Conejo 1 | | Conejo 2 | | Conejo 3 | | Conejo 4 | | Promedio |
|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | µg/ml | ufc/ml | µg/ml | ufc/ml | µg/ml | ufc/ml | µg/ml | ufc/ml | |
| 0,5 | 3,22 | 3.24E+09 | 25,13 | 5.80E+05 | 1,54 | 5.20E+05 | 12,84 | 3.04E+06 | 10,68 |
| 1 | 2,23 | 4.00E+05 | 9,30 | 9.10E+05 | 6,14 | 1.56E+06 | 14,08 | 7.00E+05 | 7,94 |
| 3 | 1,86 | 6.40E+04 | 6,39 | 7.40E+05 | 2,45 | 1.68E+04 | 7,39 | 1.97E+06 | 4,52 |
| 6 | 1,54 | 1.84E+05 | 4,68 | 8.00E+04 | 1,28 | 2.47E+05 | 4,25 | 1.02E+06 | 2,94 |
| 9 | 1,07 | 4.36E+09 | 2,91 | 1.28E+06 | 6,14 | 1.16E+06 | 11,71 | 9.20E+05 | 5,46 |
| 24 | 0,61 | 1.52E+05 | 1,85 | 3.2E+12 | 1,86 | 4.67E+06 | 8,88 | 1.12E+08 | 3,30 |



Figuras 3.3.a y 3.b correspondientes a curvas del crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en animales tratados, no tratados y concentración plasmática de cefalexina tras la administración de un bolo intramuscular de 10 mg/kg en función del tiempo.



Figuras 3.3.c y 3.d correspondientes a curvas del crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en animales tratados, no tratados y concentración plasmática de cefalexina tras la administración de un bolo intramuscular de 10 mg/kg en función del tiempo.

Las curvas concentración plasmática de cefalexina en función del tiempo para la administración intramuscular única en forma de bolo en todos los animales experimentales se ajustaron a un modelo bi-exponencial con absorción de primer orden.

$$C_p(t) = [0.55 \cdot 10 / 1.17(4.73/4.73 - 1.23)] [e^{-4.73t} - e^{-1.23t}]$$

Los parámetros cinéticos para los 4 animales experimentales así como los valores promedio (\pm DE y ES) se presentan a continuación:

| Parámetro | Conejo 1 | Conejo 2 | Conejo 3 | Conejo 4 | Promedio | D.E | Error |
|--------------------|----------|----------|----------|----------|----------|-------|-------|
| Vd/F (l/kg) | 3,53 | 0,28 | 0,82 | 0,04 | 1,17 | 1,61 | 0,81 |
| Kabs (h) | 16,99 | 0,91 | 0,74 | 0,27 | 4,73 | 8,18 | 4,09 |
| Kel (h) | 0,10 | 0,56 | 0,69 | 3,55 | 1,23 | 1,57 | 0,78 |
| AUC(μ g/h/ml) | 27,50 | 64,71 | 90,80 | 63,82 | 61,71 | 26,01 | 13,01 |
| T1/2 abs (h) | 0,04 | 0,76 | 0,94 | 2,60 | 1,08 | 1,08 | 0,54 |
| T1/2 elim (h) | 6,74 | 1,24 | 1,00 | 0,20 | 2,29 | 3,00 | 1,50 |
| Tmax (h) | 0,30 | 1,38 | 1,40 | 0,79 | 0,97 | 0,53 | 0,26 |
| Cmax (μ g/ml) | 2,74 | 16,70 | 4,64 | 13,79 | 9,47 | 6,82 | 3,41 |
| F (%) | 24,67 | 58,06 | 81,47 | 57,26 | 55,37 | 23,34 | 11,67 |

Tras la administración intramuscular en forma de bolo único, cefalexina mostró una vida media aproximadamente de 2.29 h , la cual refleja la presencia de una fase de absorción relativamente lenta. El volumen de distribución arrojó una alta variabilidad inter-animal importante, reflejando de forma similar a lo observado tras la administración intravenosa única dos poblaciones claramente diferenciadas. La

concentración máxima estimada y el tiempo de la misma, al igual que el volumen de distribución, muestra una distribución entre los animales experimentales del tipo bimodal. La biodisponibilidad es de alrededor del 60%, siendo este valor esperable para cefalexina.

3.4) Estudio de las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente, disposición plasmática y análisis cinético de cefalexina tras su administración intramuscular a la dosis de 2.5 mg/kg/6h durante un período de 24 horas.

La concentración bacteriana de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en animales control se presenta en la Tabla 3.4.a. Mientras que la misma variable conjuntamente con la concentración plasmática de cefalexina en el grupo tratado se presenta en la tabla 3.4.b.

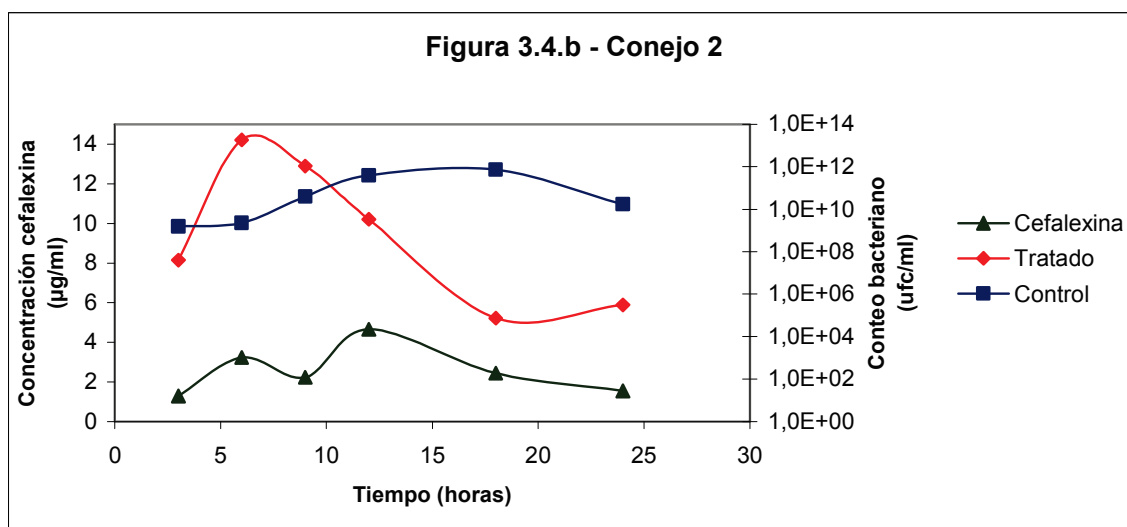
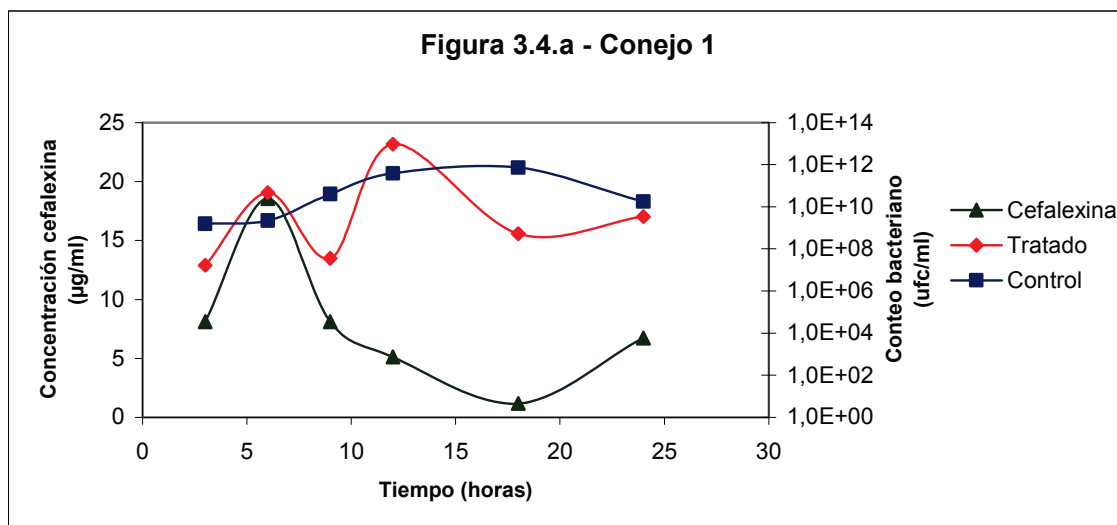
Las curvas de disposición plasmática de cefalexina tras su administración intramuscular a la dosis de 2.5 mg/kg/6h, por un periodo de 24 horas, conjuntamente con las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los DIS se presentan en las figuras 3.4.a; 4.b; 4.c y 4.d

Tabla 3.4.a: Conteos bacterianos de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en los DIS sin la ad cefalexina a la dosis de 2.5 mg/kg/6h durante un período de 24 horas (controles).

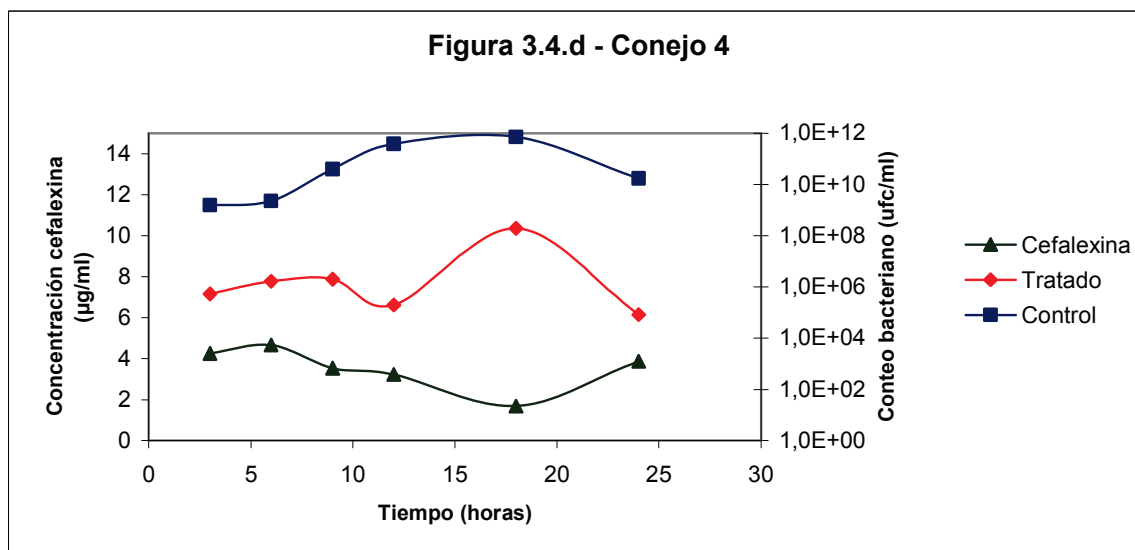
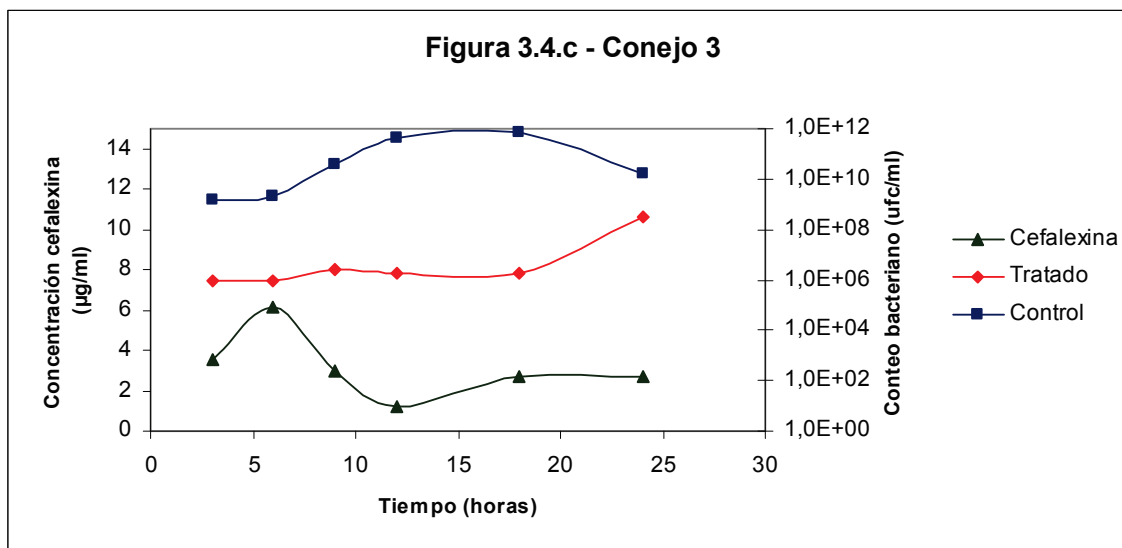
| Tiempo | Conejo 1 | | Conejo 2 | | Conejo 3 | | Conejo 4 | | Promedio | DE | E |
|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | µg/ml | Ufc/ml | µg/ml | ufc/ml | µg/ml | ufc/ml | µg/ml | ufc/ml | | | |
| 3 | 1,40E+09 | 1,50E+09 | 2,20E+09 | 9,50E+08 | 1,51E+09 | 5,10E+08 | 2,55E+09 | 1,40E+09 | 1,50E+09 | 2,20E+09 | 9,50E+08 |
| 6 | 1,70E+09 | 1,60E+09 | 1,60E+09 | 1,60E+09 | 8,70E+08 | 1,44E+09 | 3,80E+08 | 1,90E+09 | 1,70E+09 | 1,60E+09 | 1,60E+09 |
| 9 | 2,60E+10 | 3,50E+10 | 6,00E+10 | 4,20E+10 | 4,20E+10 | 4,08E+10 | 1,40E+10 | 7,00E+10 | 2,60E+10 | 3,50E+10 | 6,00E+10 |
| 12 | 8,70E+11 | 1,60E+10 | 4,20E+11 | 2,30E+11 | 3,84E+11 | 3,60E+11 | 1,80E+11 | 1,80E+11 | 8,70E+11 | 1,60E+10 | 4,20E+11 |
| 18 | 8,00E+11 | 6,80E+11 | 9,00E+11 | 5,00E+11 | 7,20E+11 | 1,70E+11 | 8,50E+11 | 8,50E+11 | 8,00E+11 | 6,80E+11 | 9,00E+11 |
| 24 | 1,60E+10 | 1,45E+10 | 2,30E+10 | 1,90E+10 | 1,81E+10 | 3,70E+09 | 1,85E+10 | 1,85E+10 | 1,60E+10 | 1,45E+10 | 2,30E+10 |

Tabla 3.4.b: Concentración plasmática de cefalexina con su correspondiente conteo bacteriano de 25923 en los DIS tras la administración intramuscular de cefalexina a la dosis de 2.5 mg/kg/6h durante

| Tiempo | Conejo 1 | | Conejo 2 | | Conejo 3 | | Conejo 4 | | Promedio |
|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | µg/ml | Ufc/ml | µg/ml | ufc/ml | µg/ml | ufc/ml | µg/ml | ufc/ml | |
| 3 | 8,10 | 1.68E+07 | 1,28 | 4.00E+07 | 3,53 | 8.50E+05 | 4,25 | 5.40E+05 | 4,29 |
| 6 | 18,56 | 4.68E+10 | 3,22 | 1,81E+16 | 6,14 | 8.60E+05 | 4,66 | 1.69E+06 | 8,15 |
| 9 | 8,10 | 3.60E+07 | 2,23 | 1,06E+15 | 2,94 | 2.80E+06 | 3,53 | 2.00E+06 | 4,20 |
| 12 | 5,11 | 9.32E+12 | 4,66 | 3.40E+09 | 1,17 | 1.69E+06 | 3,22 | 2.00E+05 | 3,54 |
| 18 | 1,17 | 5.24E+08 | 2,45 | 7.40E+04 | 2,68 | 1.80E+06 | 1,69 | 1.93E+08 | 2,00 |
| 24 | 6,74 | 3.44E+09 | 1,54 | 3.15E+05 | 2,68 | 3.40E+08 | 3,88 | 8.40E+04 | 3,71 |



Figuras 3.4.a y 4.b correspondientes a curvas del crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en animales tratados, no tratados y concentración plasmática de cefalexina tras la administración intramuscular de 2.5 mg/kg/6hs en función del tiempo.



Figuras 3.4.c y 4.d correspondientes a curvas del crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en animales tratados, no tratados y concentración plasmática de cefalexina tras la administración intramuscular de 2.5 mg/kg/6hs en función del tiempo.

Las curvas concentración plasmática de cefalexina en función del tiempo para la administración intramuscular en multidosis en todos los animales experimentales se ajustaron a un modelo bi-exponencial. Debido a que el proceso de absorción fue extremadamente rápido comparado con el de eliminación ($K_a \gg K_{el}$) $e^{-k_{at}}$ se aproximó a cero, en consecuencia se estimó exclusivamente la constante de eliminación. La ecuación promedio para los 4 animales experimentales fue:

$$C_p(t) = [0.36 \cdot 0.9 \cdot 2.5 / 0.22] e^{-0.36t}$$

Los parámetros cinéticos para los 4 animales experimentales así como los valores promedio (\pm DE y ES) se presentan a continuación:

| Parámetro | Conejo 1 | Conejo 2 | Conejo 3 | Conejo 4 | Promedio | DE | Error |
|--|----------|----------|----------|----------|----------|-------|-------|
| Volume/F(l/kg) | 0,12 | 0,48 | 0,29 | 0,25 | 0,29 | 0,15 | 0,08 |
| K unica (1/h) | 0,46 | 0,25 | 0,36 | 0,36 | 0,36 | 0,08 | 0,04 |
| AUC ($\mu\text{g}/\text{h}/\text{ml}$) | 47,05 | 20,38 | 23,70 | 27,12 | 29,56 | 11,98 | 5,99 |
| T1/2 (h) | 1,52 | 2,74 | 1,91 | 1,90 | 2,02 | 0,52 | 0,26 |
| Tmax (h) | 2,19 | 3,95 | 2,76 | 2,74 | 2,91 | 0,74 | 0,37 |
| Cmax ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | 7,92 | 1,90 | 3,16 | 3,63 | 4,15 | 2,61 | 1,31 |
| F(%) | 143,44 | 62,13 | 72,25 | 82,70 | 90,13 | 36,52 | 18,26 |
| Vd | 0,17 | 0,30 | 0,20 | 0,20 | 0,22 | 0,06 | 0,03 |
| MRT único (1/K) | 2,17 | 4,00 | 2,80 | 2,80 | 2,94 | 0,77 | 0,38 |

Tras la administración intramuscular multidosis, cefalexina mostró una rápida absorción, siendo el valor de tiempo medio reflejo de la alta distribución tras la administración multidosis. Asimismo, la biodisponibilidad fue mucho mayor a la

obtenida tras la dosis única, llegando casi al 100 %. El Tmax (representante del inicio del estado estacionario) se presentó durante la primera dosificación, reflejando nuevamente la velocidad del proceso de absorción cuando los volúmenes administrados son pequeños. Es importante remarcar la baja variabilidad intra-animal observada tanto en el volumen de distribución como en el Tmax.

ETAPA 4

Validación del modelo desarrollado a través del análisis de la curva de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente en conejos tratados con ciprofloxacina, como representante del grupo de antimicrobianos con cinética de killing bacteriano concentración dependiente.

4.1) Estudio de las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente, disposición plasmática y análisis cinético de ciprofloxacina tras su administración intravenosa a dosis única de 30 mg/kg.

La concentración bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en animales control se presenta en la Tabla 4.1.a. Mientras que la misma variable conjuntamente con la concentración plasmática de ciprofloxacina en el grupo tratado se presenta en la tabla 4.1.b.

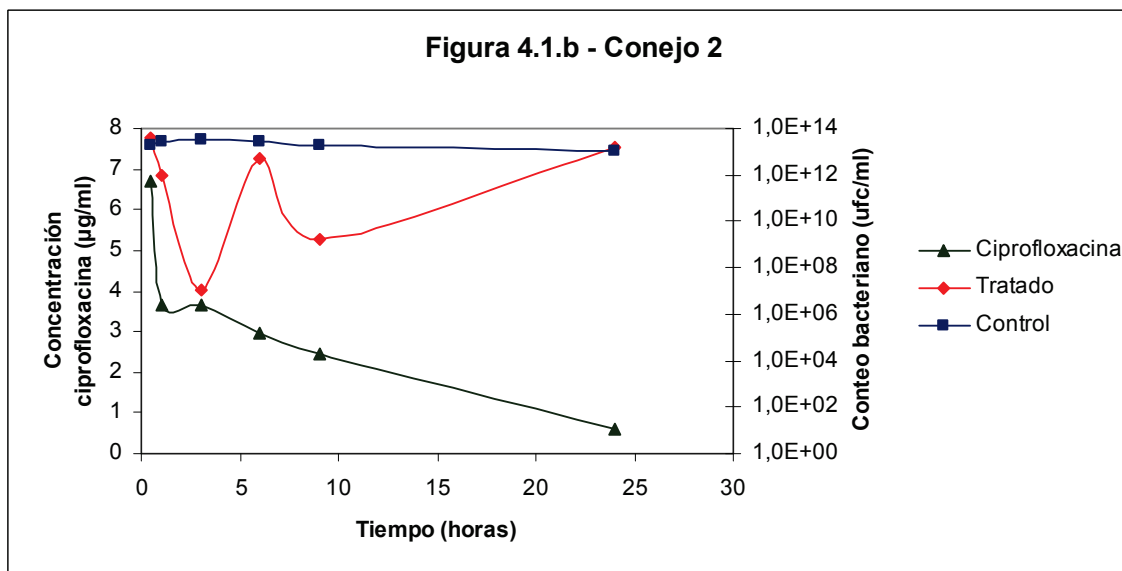
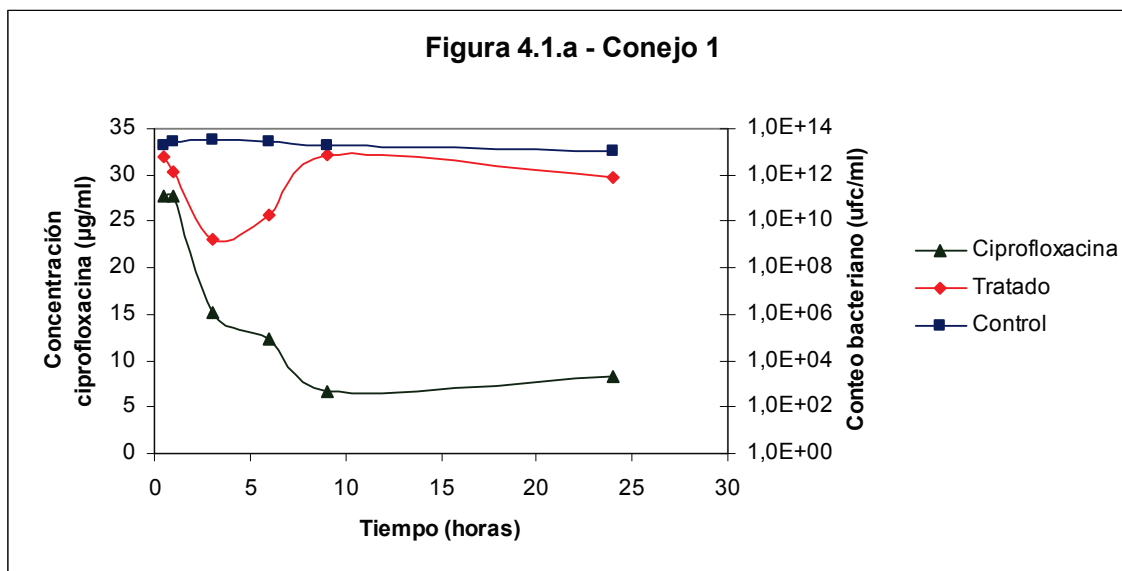
Las curvas de disposición plasmática de ciprofloxacina tras su administración intravenosa a la dosis de 30 mg/kg conjuntamente con las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los DIS se presentan en las figuras 4.1.a; 1b; 1c y 1d.

Tabla 4.1.a: Conteos bacterianos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en los DIS sin la ciprofloxacina a la dosis de 30 mg/Kg (controles).

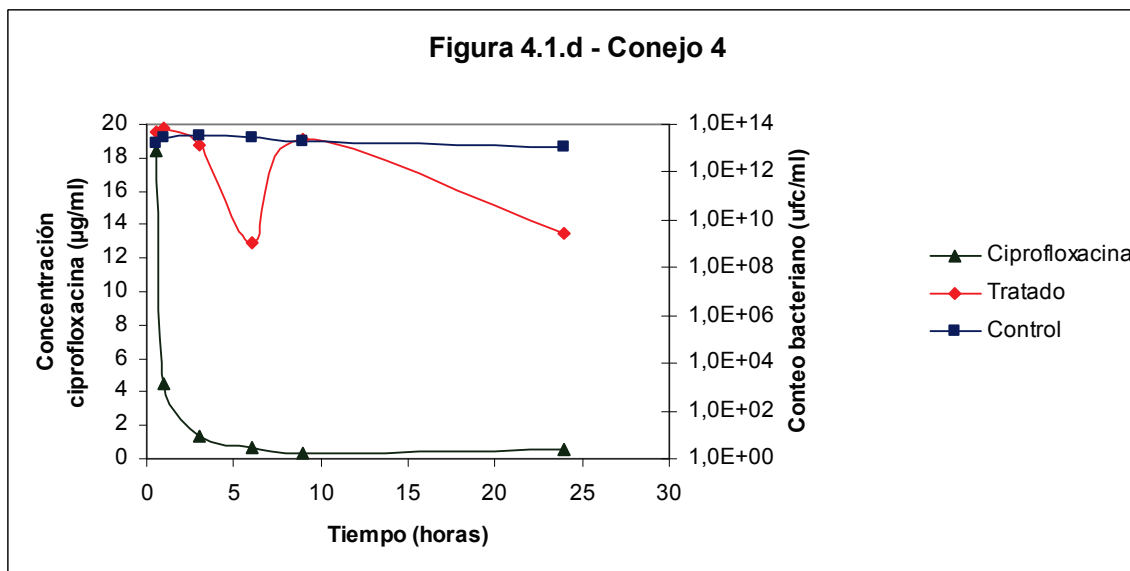
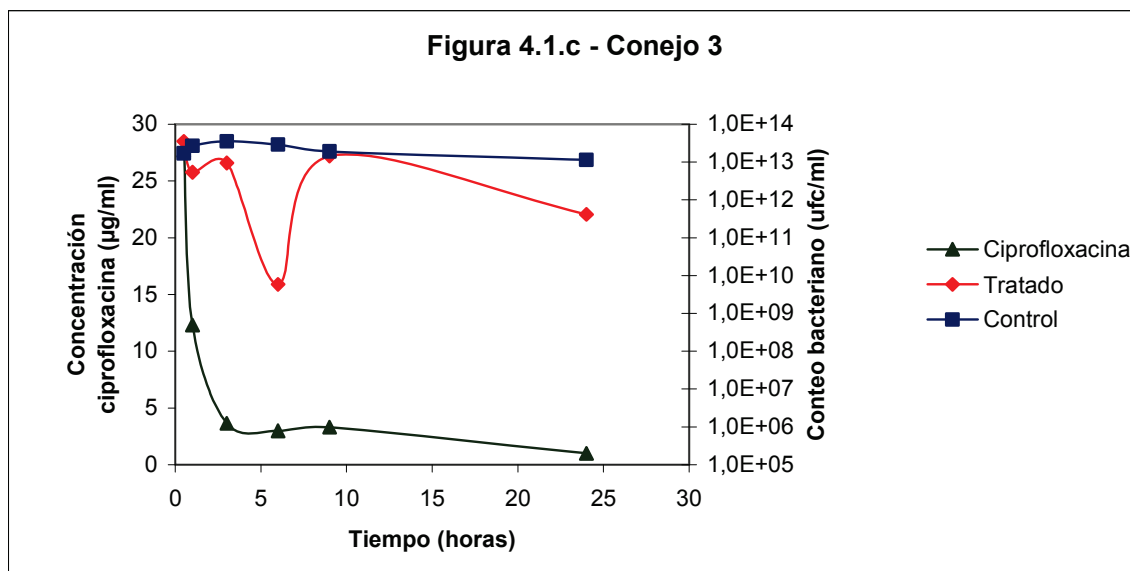
| Tiempo | Conejo 1 | Conejo 2 | Conejo 3 | Conejo 4 | Promedio | DE | E |
|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 0,5 | 1,90E+13 | 1,64E+13 | 2,10E+13 | 1,20E+13 | 1,71E+13 | 3,89E+12 | 1,94E+13 |
| 1 | 3,70E+13 | 1,84E+13 | 2,50E+13 | 2,70E+13 | 2,69E+13 | 7,70E+12 | 3,85E+13 |
| 3 | 4,30E+13 | 2,90E+13 | 3,10E+13 | 3,90E+13 | 3,55E+13 | 6,61E+12 | 3,30E+13 |
| 6 | 2,40E+13 | 1,80E+13 | 7,10E+12 | 6,70E+13 | 2,90E+13 | 2,63E+13 | 1,31E+13 |
| 9 | 3,40E+13 | 4,80E+10 | 9,80E+12 | 3,20E+13 | 1,90E+13 | 1,67E+13 | 8,36E+12 |
| 24 | 1,85E+13 | 6,20E+09 | 7,20E+12 | 2,00E+13 | 1,14E+13 | 9,52E+12 | 4,76E+12 |

Tabla 4.1.b Concentración plasmática de ciprofloxacina con su correspondiente conteo bacteriano ATCC 27853 en los DIS tras la administración intravenosa de ciprofloxacina a la dosis de 30 mg/Kg

| Tiempo | Conejo 1 | | Conejo 2 | | Conejo 3 | | Conejo 4 | | Promedio |
|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | µg/ml | Ufc/ml | µg/ml | ufc/ml | µg/ml | ufc/ml | µg/ml | ufc/ml | |
| 0,5 | 27,70 | 6,40E+12 | 6,70 | 4,16E+13 | 27,70 | 3,52E+13 | 18,47 | 4,48E+13 | 20,15 |
| 1 | 27,70 | 1,50E+12 | 3,65 | 1,00E+12 | 12,32 | 5,36E+12 | 4,47 | 6,40E+13 | 12,03 |
| 3 | 15,08 | 1,80E+09 | 3,65 | 1,20E+07 | 3,65 | 9,44E+12 | 1,32 | 1,42E+13 | 5,93 |
| 6 | 12,32 | 1,80E+10 | 2,98 | 5,20E+12 | 2,98 | 5,84E+09 | 0,72 | 1,18E+09 | 4,75 |
| 9 | 6,70 | 8,00E+12 | 2,43 | 1,60E+09 | 3,32 | 1,44E+13 | 0,32 | 2,30E+13 | 3,19 |
| 24 | 8,21 | 8,60E+11 | 0,59 | 1,44E+13 | 1,00 | 4,16E+11 | 0,59 | 2,80E+09 | 2,60 |



Figuras 4.1.a y 1b correspondientes a curvas del crecimiento bacteriano de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en conejos tratados, en conejos no tratados y concentración plasmática de ciprofloxacina tras la administración de un bolo intravenoso de 30 mg/kg en función del tiempo.



Figuras 4.1c y 1d correspondientes a curvas del crecimiento bacteriano de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en conejos tratados, en conejos no tratados y concentración plasmática de ciprofloxacina tras la administración de un bolo intravenoso de 30 mg/kg en función del tiempo.

Las curvas concentración plasmática de ciprofloxacina en función del tiempo para la administración intravenosa a dosis única en todos los animales experimentales se ajustaron a un modelo abierto monocompartimental , siendo la ecuación promedio para los cuatro animales experimentales:

$$C_p(t) = 25.9 e^{-0.56t}$$

Los parámetros cinéticos para los 4 animales experimentales así como los valores promedio (\pm DE y ES) se presentan a continuación:

| Parámetro | Conejo 1 | Conejo 2 | Conejo 3 | Conejo 4 | Promedio | D.E | Error |
|--------------------|----------|----------|----------|----------|----------|--------|--------|
| Kel (1/h) | 0,16 | 0,10 | 0,99 | 0,99 | 0,56 | 0,50 | 0,25 |
| AUC(μ g/h/ml) | 188,72 | 52,38 | 42,56 | 25,54 | 77,30 | 75,10 | 37,55 |
| T1/2 el (h) | 4,37 | 6,52 | 0,69 | 0,69 | 3,07 | 2,88 | 1,44 |
| C0 (μ g/ml) | 29,95 | 5,57 | 42,56 | 25,54 | 25,90 | 15,36 | 7,68 |
| Cl (ml/kg/h) | 0,16 | 0,57 | 0,70 | 1,17 | 0,65 | 0,42 | 0,21 |
| AUMC | 1189,36 | 492,85 | 42,56 | 25,54 | 437,58 | 545,91 | 272,95 |
| MRT (h) | 6,30 | 9,41 | 1,00 | 1,00 | 4,43 | 4,16 | 2,08 |
| Vss (l/kg) | 1,00 | 5,39 | 0,70 | 1,17 | 2,07 | 2,22 | 1,11 |
| AUC/CIM | 754,88 | 209,52 | 170,24 | 102,16 | 309,20 | 300,41 | 150,21 |

Tras la administración intravenosa en forma de bolo único, ciprofloxacina mostró una vida media aproximadamente de 3 h, sin embargo este parámetro híbrido mostró alta variabilidad como consecuencia de la variabilidad inter-animal del volumen de distribución. Aquí se observa nuevamente la presencia de dos poblaciones claramente diferenciadas. Aún así, los valores de este parámetro reflejan la alta

liposolubilidad de la molécula con valores en todos los casos cercanos/superiores al litro/kg.

El clearance también mostró cierto grado de variabilidad, aunque menos marcada que el volumen de distribución.

4.2) Estudio de las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente, disposición plasmática y análisis cinético de ciprofloxacina tras su administración intravenosa a la dosis 7.5 mg/kg/6h durante un período de 24 horas

La concentración bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en animales control se presenta en la Tabla 4.2a. Mientras que la misma variable conjuntamente con la concentración plasmática de ciprofloxacina en el grupo tratado se presenta en la tabla 4.2b.

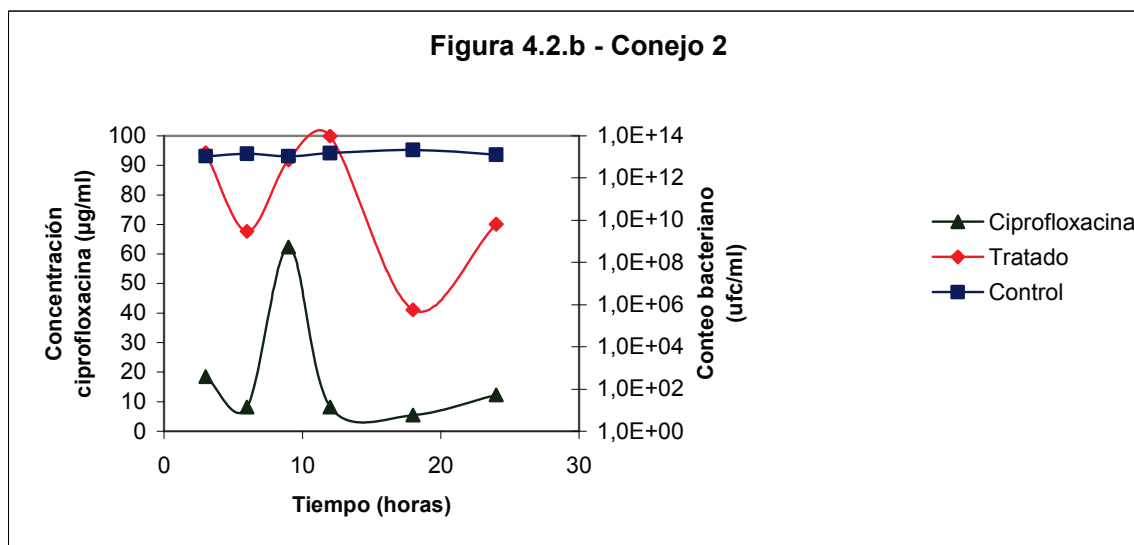
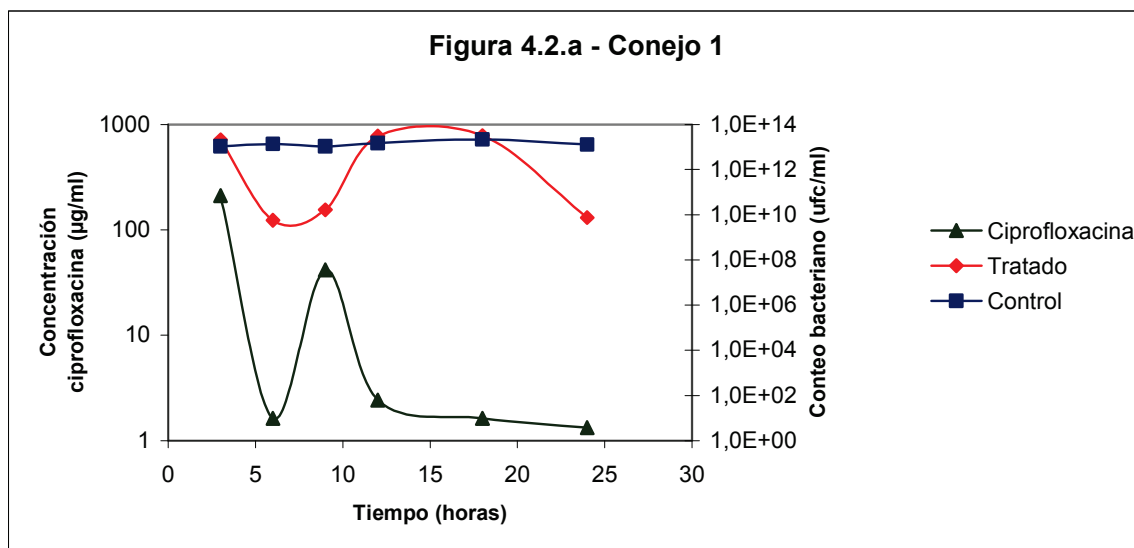
Las curvas de disposición plasmática de ciprofloxacina tras su administración intravenosa a la dosis de 7,5 mg/kg/6h conjuntamente con las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los DIS se presentan en las Figuras 4.2.a; 2.b; 2c y 2d.

Tabla 4.2.a: Conteos bacterianos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en los DIS sin la ciprofloxacina a la dosis de 7.5 mg/kg/6h durante un período de 24 horas (controles).

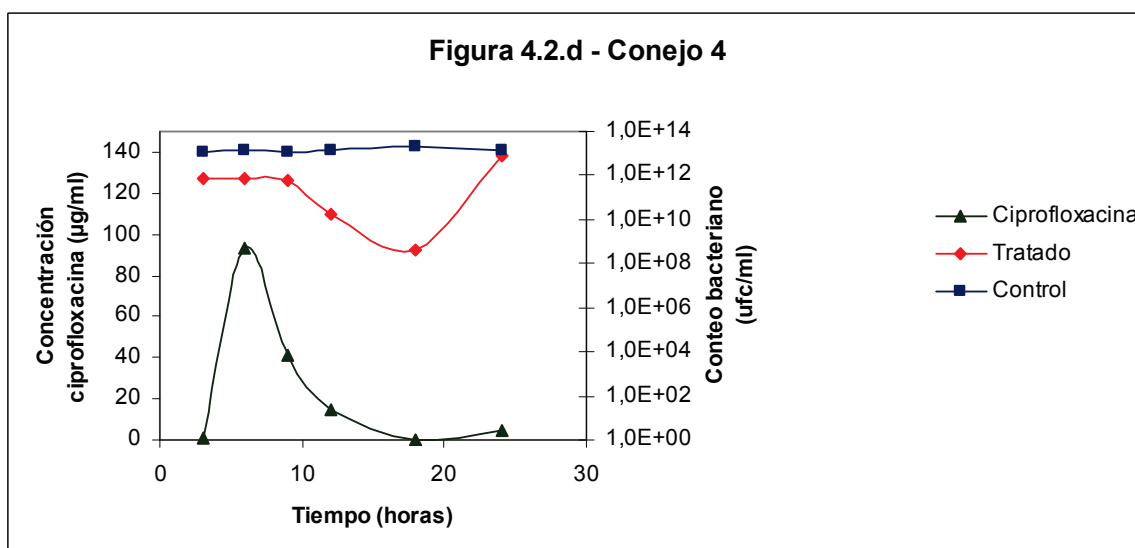
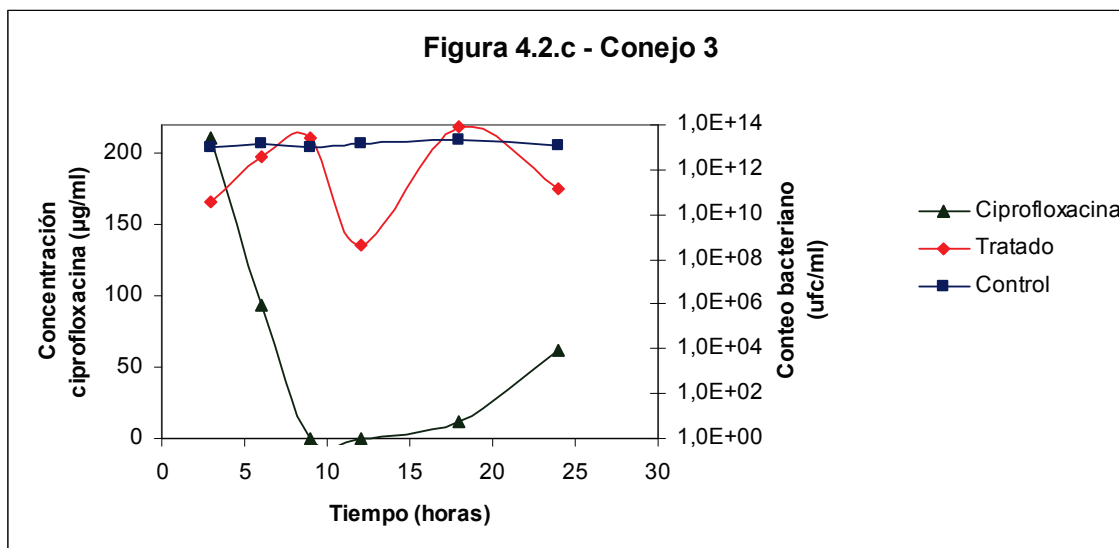
| Tiempo | Conejo 1 | Conejo 2 | Conejo 3 | Conejo 4 | Promedio | DE | E |
|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|------|
| 3 | 1,10E+10 | 2,04E+13 | 2,20E+13 | 4,48E+10 | 1,06E+13 | 1,22E+13 | 6,12 |
| 6 | 5,84E+09 | 1,84E+13 | 3,69E+13 | 1,06E+11 | 1,39E+13 | 1,76E+13 | 8,82 |
| 9 | 7,72E+10 | 4,08E+10 | 1,80E+11 | 4,24E+13 | 1,07E+13 | 2,12E+13 | 1,06 |
| 12 | 1,68E+13 | 2,44E+11 | 2,16E+13 | 2,19E+13 | 1,51E+13 | 1,02E+13 | 5,10 |
| 18 | 3,01E+13 | 3,20E+13 | 1,49E+10 | 2,42E+13 | 2,16E+13 | 1,48E+13 | 7,38 |
| 24 | 2,08E+13 | 1,17E+13 | 1,76E+10 | 1,88E+13 | 1,28E+13 | 9,39E+12 | 4,70 |

Tabla 4.2.b: Concentración plasmática de ciprofloxacina con su correspondiente conteo bacteriano ATCC 27853 en los DIS tras la administración intravenosa de ciprofloxacina a la dosis de 7.5 mg/kg/horas.

| Tiempo | Conejo 1 | | Conejo 2 | | Conejo 3 | | Conejo 4 | | Pr |
|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-------|
| | µg/ml | Ufc/ml | µg/ml | ufc/ml | µg/ml | ufc/ml | µg/ml | ufc/ml | |
| 3 | 210,3 | 2,08E+13 | 18,5 | 1,55E+13 | 210,3 | 4,00E+10 | 1,1 | 8,00E+11 | 110,0 |
| 6 | 1,6 | 5,60E+09 | 8,2 | 2,96E+09 | 93,5 | 3,60E+12 | 93,5 | 6,80E+11 | 49,2 |
| 9 | 41,6 | 1,64E+10 | 62,3 | 7,28E+12 | 0,3 | 2,72E+13 | 41,6 | 6,00E+11 | 36,4 |
| 12 | 2,4 | 3,04E+13 | 8,2 | 9,60E+13 | 0,6 | 4,72E+08 | 15,1 | 1,84E+10 | 6,6 |
| 18 | 1,6 | 3,20E+13 | 5,5 | 5,68E+05 | 12,3 | 8,30E+13 | 0,4 | 4,40E+08 | 5,0 |
| 24 | 1,3 | 7,52E+09 | 12,3 | 6,40E+09 | 62,3 | 1,48E+11 | 4,5 | 8,00E+12 | 20,1 |



Figuras 4.2.a y 2.b correspondientes a curvas del crecimiento bacteriano de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en animales tratados, no tratados y concentración plasmática de ciprofloxacina tras la administración intravenosa de 7.5 mg/kg/6hs en función del tiempo.



Figuras 4. 2.c y 2.d correspondientes a curvas del crecimiento bacteriano de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en animales tratados, no tratados y concentración plasmática de ciprofloxacina tras la administración intravenosa de 7.5 mg/kg/6hs en función del tiempo.

Las curvas concentración plasmática de ciprofloxacina en función del tiempo para la administración intravenosa a la dosis de 7.5 mg/kg/6h en todos los animales experimentales se ajustaron a un modelo abierto monocompartimental , siendo la ecuación promedio para los cuatro animales experimentales:

$$C_p(t) = 20.76 e^{-0.37t}$$

Los parámetros cinéticos para los 4 animales experimentales así como los valores promedio (\pm DE y ES) se presentan a continuación:

| Parámetro | Conejo 1 | Conejo 2 | Conejo 3 | Conejo 4 | Promedio | DE | Error |
|--------------------|----------|----------|----------|----------|----------|--------|--------|
| Kel (1/h) | 0,39 | 0,36 | 0,47 | 0,26 | 0,37 | 0,09 | 0,04 |
| AUC(μ g/h/ml) | 37,12 | 155,73 | 16,17 | 19,41 | 57,11 | 66,39 | 33,19 |
| T1/2 el (h) | 1,76 | 1,94 | 1,46 | 2,67 | 1,96 | 0,52 | 0,26 |
| C0 (μ g/ml) | 14,60 | 55,72 | 7,68 | 5,04 | 20,76 | 23,65 | 11,83 |
| Cl (ml/kg/h) | 0,20 | 0,05 | 0,46 | 0,39 | 0,28 | 0,19 | 0,09 |
| AUMC | 94,33 | 435,27 | 34,04 | 74,85 | 159,62 | 185,47 | 92,74 |
| MRT (h) | 2,54 | 2,80 | 2,11 | 3,86 | 2,82 | 0,74 | 0,37 |
| Vss (l/kg) | 0,51 | 0,13 | 0,98 | 1,49 | 0,78 | 0,59 | 0,29 |
| AUC/CIM | 148,48 | 623,00 | 64,68 | 77,64 | 228,45 | 265,60 | 132,80 |

Tras la administración intravenosa en multidosis, ciprofloxacina mostró una vida media aproximadamente de 2 h, significativamente más corta que tras la administración intravenosa única. Esto es consecuencia del menor volumen de distribución estimado tras la administración multidosis. Esta limitada distribución, también explica el alto valor de C0 (comparado con el estimado tras la administración monodosis). Nuevamente se observa una importante (aun cuando

menos marcada que en la administración única) variación inter-animal, especialmente en los parámetros que reflejan el proceso de distribución.

4.3) Estudio de las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente, disposición plasmática y análisis cinético de ciprofloxacina tras su administración intramuscular a dosis única de 30 mg/kg.

La concentración bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en animales control se presenta en la Tabla 4.3.a. Mientras que la misma variable conjuntamente con la concentración plasmática de ciprofloxacina en el grupo tratado se presenta en la tabla 4.3.b.

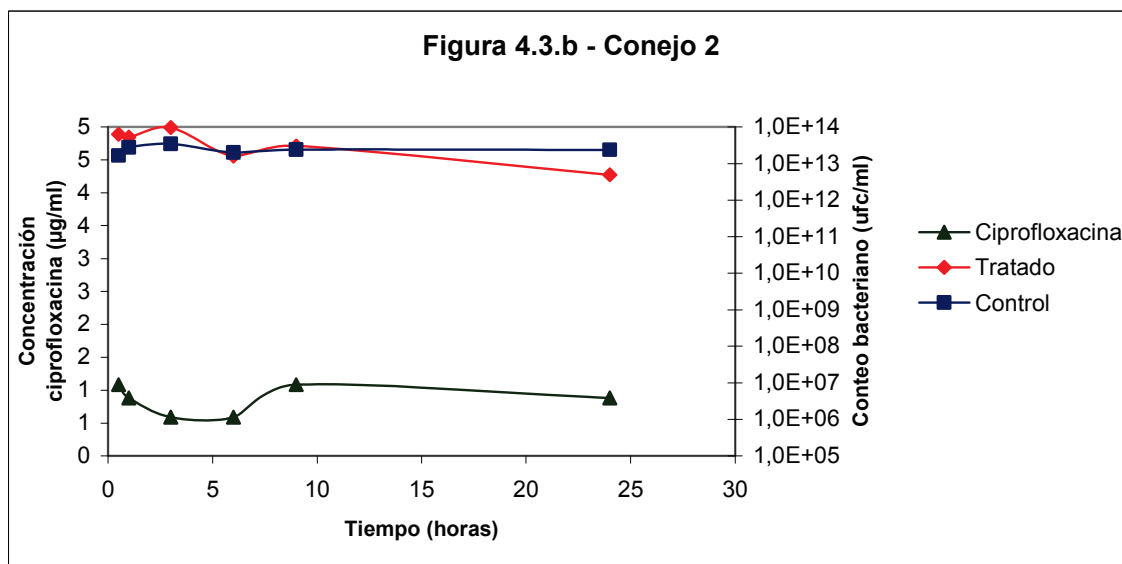
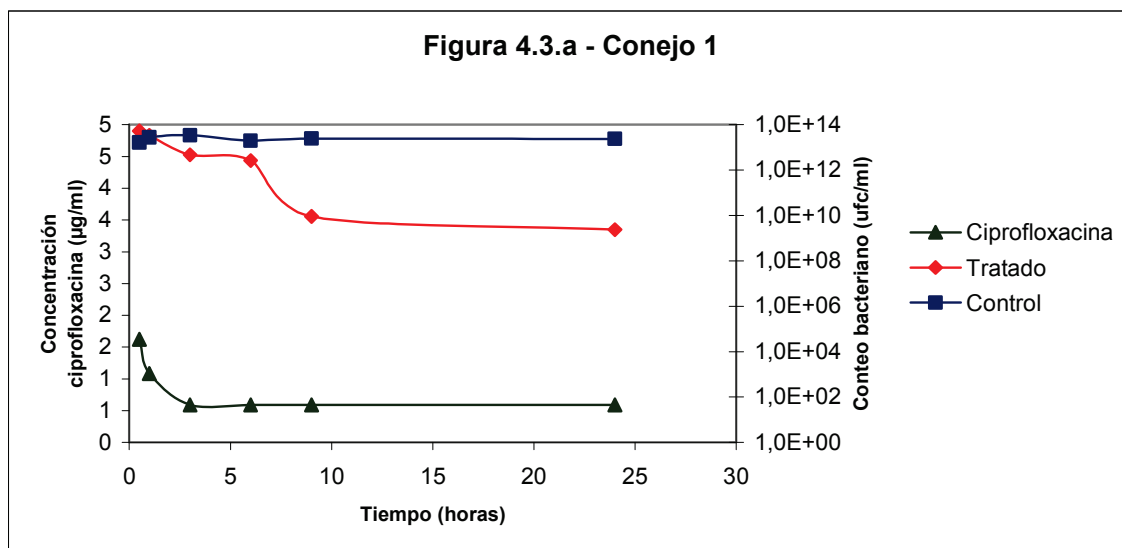
Las curvas de disposición plasmática de ciprofloxacina tras su administración intramuscular única a la dosis de 30 mg/kg conjuntamente con las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los DIS se presentan en las figuras 4.3.a; 3.b; 3.c y 3.d.

Tabla 4.3.a: Conteos bacterianos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en los DIS sin la adición de ciprofloxacina a la dosis de 30 mg/Kg (controles).

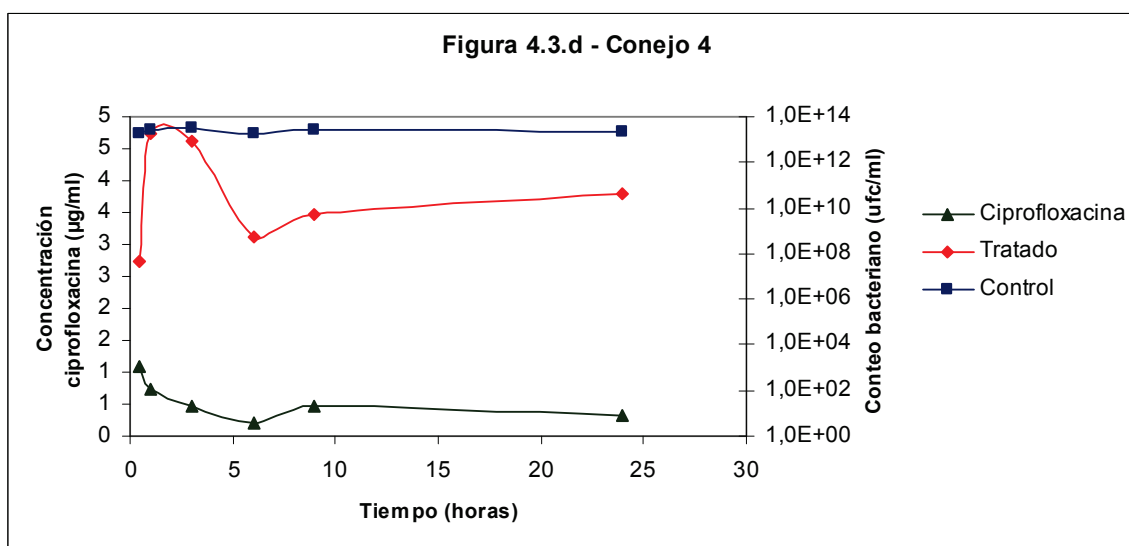
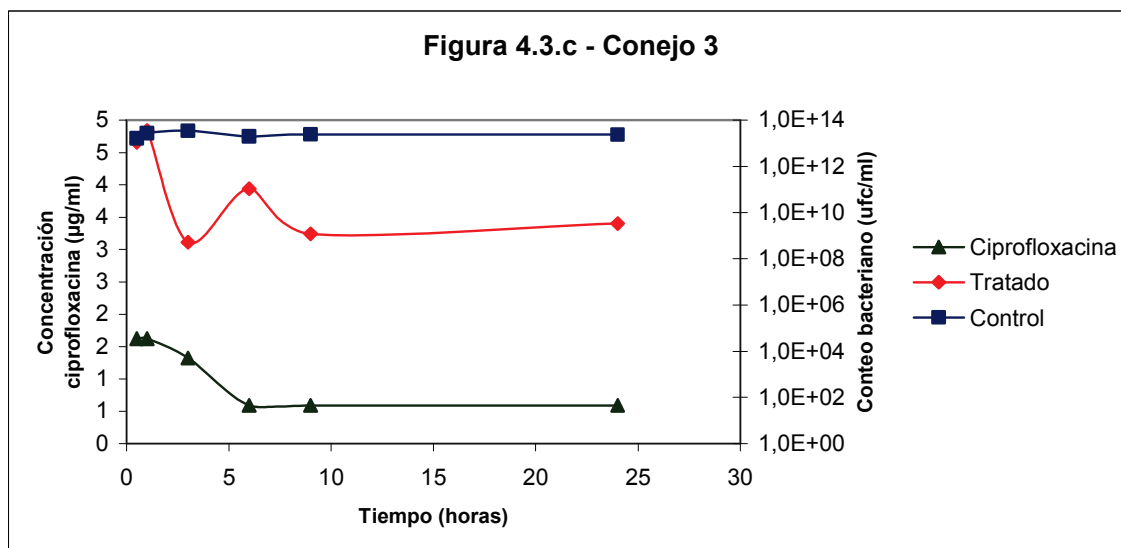
| Tiempo | Conejo 1 | Conejo 2 | Conejo 3 | Conejo 4 | Promedio | DE | E |
|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 0,5 | 2,00E+13 | 1,80E+13 | 1,20E+13 | 1,90E+13 | 1,73E+13 | 1,73E+13 | 8,63E+12 |
| 1 | 4,00E+13 | 1,94E+13 | 2,30E+13 | 3,00E+13 | 2,81E+13 | 2,81E+13 | 1,41E+13 |
| 3 | 4,25E+13 | 3,10E+13 | 2,90E+13 | 3,60E+13 | 3,46E+13 | 3,46E+13 | 1,73E+13 |
| 6 | 2,00E+13 | 2,15E+13 | 3,40E+13 | 7,45E+12 | 2,07E+13 | 2,07E+13 | 1,04E+13 |
| 9 | 3,60E+13 | 5,00E+13 | 8,20E+12 | 6,70E+12 | 2,52E+13 | 2,52E+13 | 1,20E+13 |
| 24 | 2,00E+13 | 6,45E+13 | 6,00E+12 | 7,80E+12 | 2,46E+13 | 2,46E+13 | 1,23E+13 |

Tabla 4.3.b Concentración plasmática de ciprofloxacina con su correspondiente conteo bacteriano ATCC 27853 en los DIS tras la administración intramuscular de ciprofloxacina a la dosis de 30 mg/Kg

| Tiempo | Conejo 1 | | Conejo 2 | | Conejo 3 | | Conejo 4 | | Pr |
|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|------|
| | µg/ml | Ufc/ml | µg/ml | ufc/ml | µg/ml | ufc/ml | µg/ml | ufc/ml | |
| 0,5 | 1,62 | 5,20E+13 | 1,08 | 6,40E+13 | 1,62 | 1,14E+13 | 1,08 | 4,88E+07 | 1,35 |
| 1 | 1,08 | 3,46E+13 | 0,88 | 5,28E+13 | 1,62 | 3,60E+13 | 0,72 | 1,68E+13 | 1,08 |
| 3 | 0,59 | 4,69E+12 | 0,59 | 9,60E+13 | 1,32 | 5,20E+08 | 0,48 | 8,88E+12 | 0,75 |
| 6 | 0,59 | 2,64E+12 | 0,59 | 1,60E+13 | 0,59 | 1,09E+11 | 0,21 | 4,88E+08 | 0,50 |
| 9 | 0,59 | 9,12E+09 | 1,08 | 3,04E+13 | 0,59 | 1,20E+09 | 0,48 | 4,80E+09 | 0,69 |
| 24 | 0,59 | 2,40E+09 | 0,88 | 4,90E+12 | 0,59 | 3,36E+09 | 0,32 | 4,50E+10 | 0,60 |



Figuras 4.3.a; 3.b; 3.c y 3.d correspondientes a curvas del crecimiento bacteriano de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en conejos tratados, en conejos no tratados y concentración plasmática de ciprofloxacin tras la administración de un bolo intramuscular de 30 mg/kg en función del tiempo.



Figuras 4.3.a; 3.b; 3.c y 3.d correspondientes a curvas del crecimiento bacteriano de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en conejos tratados, en conejos no tratados y concentración plasmática de ciprofloxacina tras la administración de un bolo intramuscular de 30 mg/kg en función del tiempo.

Las curvas concentración plasmática de ciprofloxacina en función del tiempo para la administración intramuscular única en forma de bolo en todos los animales experimentales se ajustaron a un modelo bi-exponencial con absorción de primer orden.

$$C_p(t) = [0.07 \cdot 30 / 2.25 (11.31 / 11.31 - 0.20)] [e^{-11.31t} - e^{-0.20t}]$$

Los parámetros cinéticos para los 4 animales experimentales así como los valores promedio (\pm DE y ES) se presentan a continuación:

| Parámetro | Conejo 1 | Conejo 2 | Conejo 3 | Conejo 4 | Promedio | DE | Error |
|--------------------|----------|----------|----------|----------|----------|-------|-------|
| Vd/F (l/kg) | 27,98 | 43,71 | 16,41 | 38,02 | 31,53 | 11,99 | 6,00 |
| Kabs (h) | 4,25 | 19,30 | 4,30 | 17,38 | 11,31 | 8,16 | 4,08 |
| Kel (h) | 0,14 | 0,12 | 0,24 | 0,32 | 0,20 | 0,10 | 0,05 |
| AUC(μ g/h/ml) | 7,92 | 5,90 | 7,49 | 2,47 | 5,94 | 2,47 | 1,24 |
| T1/2 abs (h) | 0,16 | 0,04 | 0,16 | 0,04 | 0,10 | 0,07 | 0,04 |
| T1/2 elim (h) | 5,12 | 5,96 | 2,84 | 2,17 | 4,02 | 1,81 | 0,90 |
| Tmax (h) | 0,84 | 0,27 | 0,71 | 0,23 | 0,51 | 0,31 | 0,15 |
| Cmax (μ g/ml) | 0,96 | 0,67 | 1,54 | 0,73 | 0,97 | 0,40 | 0,20 |
| F (%) | 10,25 | 7,63 | 9,68 | 3,20 | 7,69 | 3,20 | 1,60 |
| Vd | 2,86 | 3,33 | 1,60 | 1,21 | 2,25 | 1,01 | 0,50 |
| AUC/CIM | 31,68 | 23,60 | 29,96 | 9,88 | 23,78 | 9,90 | 4,95 |

Probablemente lo más llamativo del análisis de las curvas de disposición de ciprofloxacina administrada por vía intramuscular a dosis única de 30 mg/kg es su muy pobre biodisponibilidad. Este parámetro no supero el 10% en ninguno de los animales experimentales. Este hecho se refleja en la muy baja AUC (10 veces

menor a la estimada tras la administración intravenosa), así como, en el valor de C_{max}.

4.4) Estudio de las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente, disposición plasmática y análisis cinético de ciprofloxacina tras su administración intramuscular a la dosis 7.5 mg/kg/6h durante un período de 24 horas

La concentración bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en animales control se presenta en la Tabla 4.4.a. Mientras que la misma variable conjuntamente con la concentración plasmática de ciprofloxacina en el grupo tratado se presenta en la tabla 4.4.b.

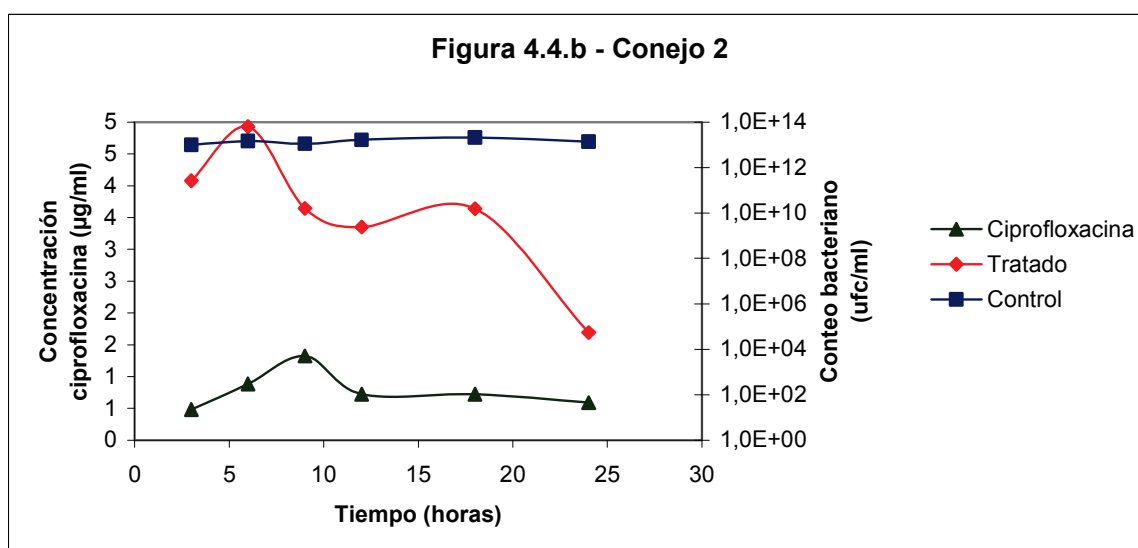
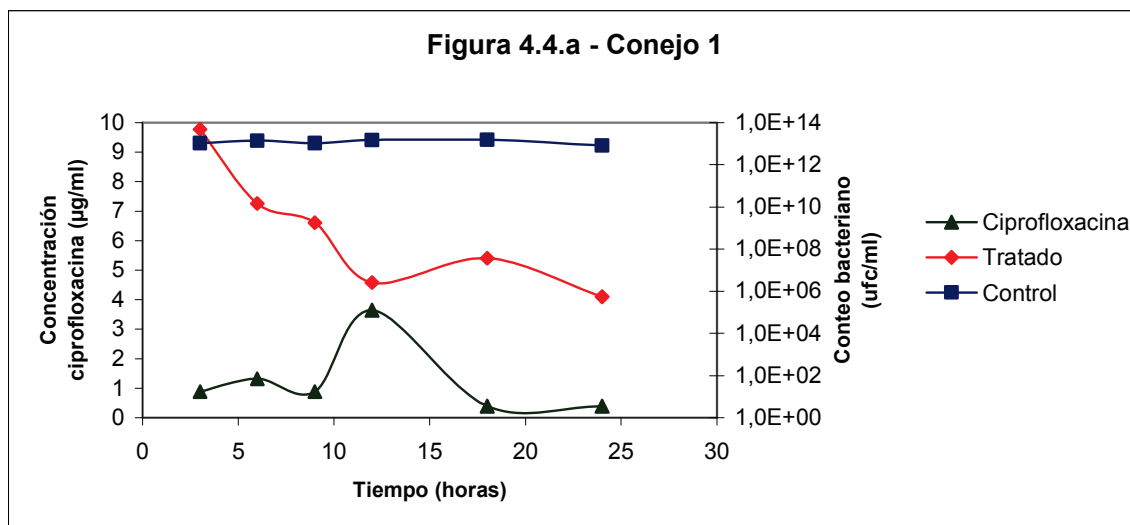
Las curvas de disposición plasmática de ciprofloxacina tras su administración intramuscular a la dosis de 2.5 mg/kg/6h, por un periodo de 24 horas, conjuntamente con las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los DIS se presentan en las figuras 4.4.a; 4.b; 4.c y 4.d

Tabla 4.4.a: Conteos bacterianos de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en los DIS sin la adición de ciprofloxacina a la dosis de 7.5 mg/kg/6h durante un período de 24 horas (controles).

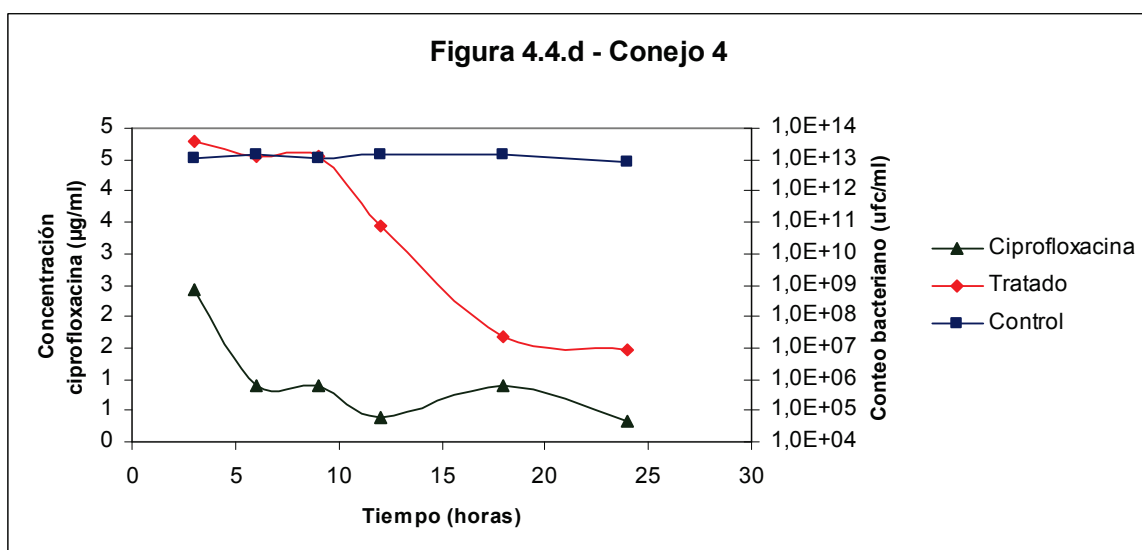
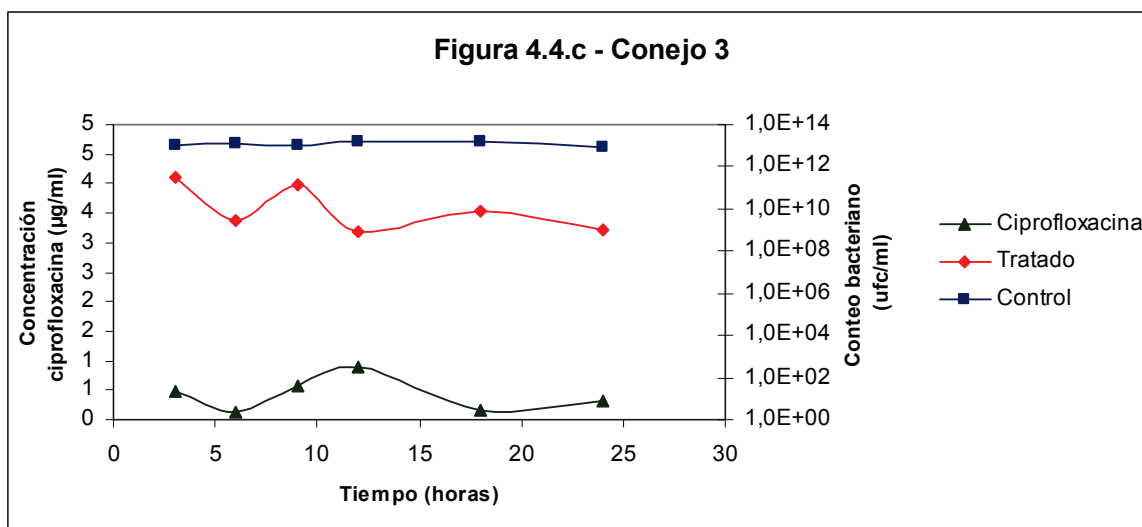
| Tiempo | Conejo 1 | | Conejo 2 | | Conejo 3 | | Conejo 4 | | Promedio | DE | E | | | | |
|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | µg/ml | Ufc/ml | µg/ml | ufc/ml | µg/ml | ufc/ml | µg/ml | ufc/ml | | | | | | | |
| 3 | 1,00E+10 | 1,90E+13 | 2,00E+13 | 6,00E+10 | 9,77E+12 | 1,22E+13 | 6,12E+12 | 5,00E+09 | 2,00E+13 | 3,80E+13 | 1,30E+11 | 1,45E+13 | 1,76E+13 | 8,82E+12 | 8,82E+12 |
| 6 | 5,00E+09 | 2,00E+13 | 3,80E+13 | 1,30E+11 | 1,45E+13 | 1,76E+13 | 8,82E+12 | 8,82E+12 | 8,82E+12 | 8,82E+12 | 1,06E+13 | 2,12E+13 | 1,06E+13 | 1,06E+13 | 1,06E+13 |
| 9 | 8,00E+10 | 3,80E+10 | 2,00E+11 | 4,40E+13 | 1,11E+13 | 2,12E+13 | 1,06E+13 | 1,06E+13 | 1,06E+13 | 1,06E+13 | 2,12E+13 | 1,06E+13 | 2,12E+13 | 1,06E+13 | 1,06E+13 |
| 12 | 1,73E+13 | 2,60E+11 | 2,40E+13 | 2,40E+13 | 1,64E+13 | 1,02E+13 | 5,10E+12 | 5,10E+12 | 5,10E+12 | 5,10E+12 | 1,02E+13 | 1,02E+13 | 1,02E+13 | 5,10E+12 | 5,10E+12 |
| 18 | 2,78E+13 | 3,00E+13 | 1,60E+10 | 2,60E+13 | 2,10E+13 | 1,79E+13 | 8,90E+12 | 8,90E+12 | 8,90E+12 | 8,90E+12 | 1,79E+13 | 1,79E+13 | 1,79E+13 | 8,90E+12 | 8,90E+12 |
| 24 | 1,89E+13 | 1,50E+13 | 1,80E+10 | 2,10E+13 | 1,37E+13 | 1,01E+13 | 5,04E+12 | 5,04E+12 | 5,04E+12 | 5,04E+12 | 1,01E+13 | 1,01E+13 | 1,01E+13 | 5,04E+12 | 5,04E+12 |

Tabla 4.4.b Concentración plasmática de ciprofloxacina con su correspondiente conteo bacteriano ATCC 27853 en los DIS tras la administración intramuscular de ciprofloxacina a la dosis de 7.5 mg/kg/horas.

| Tiempo | Conejo 1 | | Conejo 2 | | Conejo 3 | | Conejo 4 | | Promedio |
|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | µg/ml | Ufc/ml | µg/ml | ufc/ml | µg/ml | ufc/ml | µg/ml | ufc/ml | |
| 3 | 0,88 | 4,80E+13 | 0,48 | 2,60E+11 | 0,48 | 3,20E+11 | 2,43 | 3,90E+13 | 0,84 |
| 6 | 1,32 | 1,44E+10 | 0,88 | 6,40E+13 | 0,14 | 2,56E+09 | 0,88 | 1,20E+13 | 0,62 |
| 9 | 0,88 | 1,77E+09 | 1,32 | 1,60E+10 | 0,59 | 1,40E+11 | 0,88 | 1,20E+13 | 0,88 |
| 12 | 3,65 | 2,60E+06 | 0,72 | 2,40E+09 | 0,88 | 8,00E+08 | 0,39 | 8,00E+10 | 0,98 |
| 18 | 0,39 | 3,76E+07 | 0,72 | 1,56E+10 | 0,17 | 8,24E+09 | 0,88 | 2,30E+07 | 0,46 |
| 24 | 0,39 | 5,60E+05 | 0,59 | 5,40E+04 | 0,32 | 9,60E+08 | 0,32 | 9,12E+06 | 0,39 |



Figuras 4.4.a y 4.b correspondientes a curvas del crecimiento bacteriano de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en animales tratados, no tratados y concentración plasmática de ciprofloxacin tras la administración intramuscular de 7.5 mg/kg/6hs en función del tiempo.



Figuras 4. 4.c y 4.d correspondientes a curvas del crecimiento bacteriano de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en animales tratados, no tratados y concentración plasmática de ciprofloxacina tras la administración intramuscular de 7.5 mg/kg/6hs en función del tiempo

Las curvas concentración plasmática de ciprofloxacina en función del tiempo para la administración intramuscular en multidosis en todos los animales experimentales se ajustaron a un modelo bi-exponencial. Debido a que el proceso de absorción fue extremadamente rápido comparado con el de eliminación ($K_a \gg K_{el}$) $e^{-k_{at}}$ se aproximó a cero, en consecuencia se estimó exclusivamente la constante de eliminación. La ecuación promedio para los 4 animales experimentales fue:

$$C_p(t) = [0.37 * 1.3 * 7.5 / 0.40] e^{-0.37t}$$

Los parámetros cinéticos para los 4 animales experimentales así como los valores promedio (\pm DE y ES) se presentan a continuación:

| Parámetro | Conejo 1 | Conejo 2 | Conejo 3 | Conejo 4 | Promedio | DE | Error |
|--|----------|----------|----------|----------|----------|-------|-------|
| Volume/F(l/kg) | 2,76 | 3,59 | 6,32 | 1,32 | 3,50 | 2,10 | 1,05 |
| K única (1/h) | 0,22 | 0,33 | 0,32 | 0,63 | 0,37 | 0,18 | 0,09 |
| AUC ($\mu\text{g}/\text{h}/\text{ml}$) | 12,42 | 6,39 | 3,68 | 9,06 | 7,89 | 3,73 | 1,87 |
| T1/2 (h) | 3,17 | 2,12 | 2,15 | 1,11 | 2,14 | 0,84 | 0,42 |
| Tmax (h) | 4,57 | 3,05 | 3,11 | 1,60 | 3,08 | 1,21 | 0,61 |
| Cmax ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | 1,00 | 0,77 | 0,44 | 2,08 | 1,07 | 0,71 | 0,36 |
| F | 22,00 | 11,00 | 6,50 | 16,00 | 13,88 | 6,66 | 3,33 |
| Vd | 0,60 | 0,40 | 0,40 | 0,21 | 0,40 | 0,16 | 0,08 |
| AUC/CIM | 49,68 | 25,56 | 14,72 | 36,24 | 31,55 | 14,94 | 7,47 |

Comparado con la administración intramuscular de dosis única, la administración en multidosis mejora de manera muy significativa la biodisponibilidad, la cual fue máxima en todos los animales experimentales. Esto está acompañado por una muy

alta C_{max} (similar a la estimada tras la administración única de una dosis 4 veces mayor). Esto podría ser consecuencia del menor volumen inyectado comparado con la administración monodosis.

Es interesante remarcar la más acotada distribución observada tras la administración multidosis, comparada con la monodosis, lo que se refleja en el menor tiempo medio de eliminación.

IV - DISCUSION Y CONCLUSIONES

1.- DISCUSION Y CONCLUSIONES PARCIALES ETAPAS 1 y 2.

Diseño y evaluación de la inocuidad y aplicabilidad de un dispositivo de implantación subcutánea (dis) que permita el análisis in vivo del crecimiento bacteriano.

Los resultados expuestos en esta etapa demuestran que los DIS cumplen los requerimientos para la aplicación del presente modelo experimental.

En primer lugar, la ausencia de reacción tisular de tipo inflamatorio en el sitio de implantación por un periodo de 72 h nos indica que el polipropileno no induce reacciones de rechazo por parte del tejido subcutáneo. En segundo lugar, la ausencia de *Escherichia coli* ATCC 25922 en la zona de implantación, nos indica el correcto cierre de los DIS ofreciendo una herramienta útil para el estudio PK/PD sin el riesgo de provocar procesos infecciosos locales o sistémicos que podrían poner en riesgo la vida del animal experimental.

Probablemente, la prueba de oro para demostrar la aplicabilidad de los DIS en el presente modelo fue la presentada en el apartado 1.2. En el mismo se realizó un estudio comparativo del crecimiento bacteriano dentro de los DIS incubados en estufa a 37°C con los implantados en conejos. Este estudio demostró que en el interior de los DIS las bacterias crecieron de manera similar a la observada tras la incubación en estufa, mostrando las típicas curvas de crecimiento bacteriano que se observan como patrón de crecimiento en todos los microorganismos (Brock, 1993). Estos resultados indican que en el interior de los DIS se genera un ambiente propicio para el desarrollo de una cepa bacteriana.

Puesta a punto de métodos analíticos

Para ambos antimicrobianos el método cumplió con todos los requisitos de validación planteados, una precisión menor al 20% y una exactitud cercana al 100%. El método microbiológico para el dosaje de las concentraciones de cefalexina en plasma de conejo es aplicable ya que este antimicrobiano no posee en conejos metabolitos activos, por lo tanto la concentración plasmática correlaciona de manera certera con la actividad antimicrobiana. Por otro lado, la alta correlación entre este método y otros métodos analíticos incluida la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) ha sido reportada. (Steppe y col., 2003)

La aplicación del método microbiológico para el dosaje de ciprofloxacina en plasma es adecuado dado que en conejos no se reporta la presencia de metabolitos activos a concentraciones clínicamente activas (Aramayona y col., 1996). Asimismo, una alta correlación entre este método y la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) ha sido reportada (Weber y col., 1988).

2.- DISCUSION Y CONCLUSIONES PARCIALES ETAPA 3

Validación del modelo desarrollado a través del análisis de la curva de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente en conejos tratados con cefalexina, como representante del grupo de antimicrobianos con cinética de killing bacteriano tiempo dependiente.

Para analizar los siguientes tratamientos, hay que recordar que cefalexina, al igual que el resto de los betaláctamicos, es un antimicrobiano de baja liposolubilidad, que no sufre metabolismo a nivel hepático y se elimina por secreción renal activa. Asimismo, se clasifica como de cinética de muerte bacteriana tiempo-dependiente. Esto implica que la máxima eficacia clínica se correlaciona con el tiempo de exposición de la bacteria al fármaco, de ahí que el predictor de eficacia es el tiempo durante el cual la concentración plasmática de droga libre se mantiene por encima de la concentración inhibitoria mínima de la bacteria blanco ($T > CIM$).

2.1.- Estudio de las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente, disposición plasmática y análisis cinético de cefalexina tras su administración intravenosa a dosis única de 10 mg/kg.

Los resultados obtenidos en este estudio permiten identificar 2 poblaciones en lo referente al comportamiento cinético. Los animales 1 y 2 se diferencian claramente de los animales 3 y 4 (ver apartado 3.1, sección resultados) en su perfil de disposición cinética del fármaco.

Los animales 1 y 2 muestran el perfil típico de los betalactámicos (Bergan, 1984); un volumen de distribución relativamente bajo refleja su limitada distribución, consecuencia de su característica baja liposolubilidad, con un clearance intermedio típico de los fármacos que carecen de metabolismo hepático y deben su eliminación exclusivamente a procesos a nivel renal.

Observando el apartado 3.1, las diferencias entre los grupos se observan fundamentalmente en el proceso de distribución y afecta a los parámetros cinéticos

derivados del mismo. El valor del V_d es extremadamente bajo en los animales 3 y 4, aún para un antibiótico de pobre liposolubilidad. Las diferencias en vida media, considerando que los valores de clearance corporal no se diferencian significativamente entre los animales experimentales, reafirman que el origen de la diferencia está relacionado al proceso de distribución. Es importante destacar la característica híbrida de la constante de tasa de eliminación y de la vida media (ambos parámetros están determinados tanto por el proceso de distribución como de eliminación), lo que los transforma en malos candidatos para identificar los orígenes de las diferencias en los perfiles de distribución (Toutain y Bousquet-Melou (a), 2004).

Como mencionamos, el origen de las diferencias está indudablemente relacionado al proceso de distribución. En este contexto, la velocidad y extensión de la distribución de los fármacos está determinado, en general, por características del fármaco (grado y afinidad de la unión a proteínas plasmáticas, tamaño molecular, liposolubilidad intrínseca, estado iónico, etc) así como, del organismo (concentración de proteínas plasmáticas, pH, estado hemodinámico, etc) (Toutain y Bousquet-Melou (b), 2004).

Una de las fuentes de variación que podría estar incidiendo en la discriminación de las dos poblaciones, está relacionada a la concentración de proteínas plasmáticas (especialmente albúminas) en los animales experimentales. Aún cuando se trabajó con animales de la misma raza, peso, edad y estado sanitario, existen en la raza New Zealand diferentes cepas y aquí podría radicar la fuente de variación.

En la raza New Zealand, la más usada en laboratorio, existen, de acuerdo a la American Rabbit Breeders Association, cuatro cepas, a saber: blanca, roja, broken y negra.

Si bien las distintas cepas son genéticamente muy similares, se han reportado diferencias en la concentración de proteínas plasmáticas totales (Evans, 1994) (Cazabon y col, 2000). Desafortunadamente ninguna de las publicaciones describe las diferencias de forma cualitativa.

Los cambios notorios en el volumen de distribución como consecuencia de las variaciones en la concentración circulante de albúminas ha sido reportado para un gran número de antibióticos (Kunin y col. 1973)

Como se mencionó previamente, la cepa de conejo utilizada puede ser una fuente de variación del volumen de distribución debido a las diferencias reportadas. En el presente estudio, los conejos 3 y 4 pertenecían a la cepa negra, para la cual se reporta una mayor concentración plasmática de proteínas totales. Esta mayor oferta de sitios de unión para cefalexina, tendría como consecuencia una reducción en el volumen de distribución.

Desafortunadamente, no se cuenta con datos bibliográficos sobre el porcentaje de unión de cefalexina a albúmina de conejos. Sin embargo, basado en la diferencia de los diámetros de los halos de inhibición del cultivo bacteriano provocados por cefalexina diluida en agua y en plasma obtenidos en el presente trabajo de tesis, se estimó un 20 % de unión. Para otras especies, como caballos, caninos y humanos los valores reportados son 23, 20 y 12 %, respectivamente (Papich y col., 2010 ; Singhvi y col., 1977; Davis y col., 2005)

En lo que se refiere a los parámetros farmacodinámicos el $T > CIM$ (considerando un valor de CIM de 0,125) para todos los animales experimentales se estimó en 24 horas. Sin embargo, y en concordancia con los perfiles de disposición plasmática, se pueden identificar dos poblaciones con diferencias en la respuesta antibacteriana. Los animales 1 y 2 con una muy buena respuesta, mientras que el 3 y el 4 muestran una respuesta pobre.

Estas diferencias podrían estar reflejando la menor distribución de cefalexina, mencionada y discutida anteriormente. Si consideramos que en los conejos negros (3 y 4) había mayor concentración de albúmina y en consecuencia, mayor porcentaje de unión de cefalexina a la misma, la concentración de droga libre con capacidad para penetrar los DIS fue significativamente menor (comparada con los conejos blancos 1 y 2) no siendo suficiente para provocar una inhibición sostenida del crecimiento bacteriano.

En este punto es importante remarcar que la penetración del antimicrobiano al interior de los DIS se encuentra regida por la ley de difusión de Fick (Nelson, 1961), la cual explica que la velocidad de pasaje de las moléculas a través de membranas semipermeables es directamente proporcional al gradiente de concentración entre los compartimentos que estas separan; este pasaje provoca un equilibrio entre los dos sistemas con el cual se logra la actividad bactericida en el interior del DIS.

El pasaje entre compartimentos se encuentra influenciado por el área capilar que fue considerada por Anderson y col., en 1995 y por Ensink y col., en 1992 al explicar cómo en infecciones ubicadas en el espacio extracelular el antimicrobiano llega a un estado de equilibrio entre el compartimento vascular y el compartimento tisular. Dichos autores definen la relación área capilar/volumen del espacio al cual

difunde el antimicrobiano (AC/V) como la determinante de la velocidad de equilibrio entre el plasma y el fluido extracelular. Una relación AC/V alta determina un equilibrio rápido con altas concentraciones tisulares. Inversamente, una relación AC/V baja determina un equilibrio lento con bajas concentraciones tisulares. En nuestro caso, podemos aplicar dicha relación en la evaluación de los cambios que podrían ser causados por mayores o menores áreas capilares, debido a que el volumen del espacio al que difunde (DIS) es constante.

Esto nos deja entrever que si bien los cálculos farmacocinéticos/ farmacodinámicos son una herramienta importante para evaluar la eficacia de las drogas, hay que tener recordar que son cálculos matemáticos que deben, necesariamente, estar sustentados en procesos biológicos medibles que suceden en un organismo vivo como entidad. Por esto y conociendo la complejidad de los organismos hay que manejar la posibilidad de que puedan existir ciertos cambios o sucesos, que por mínimos, escapan a los cálculos matemáticos.

2.2.- Estudio de las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente, disposición plasmática y análisis cinético de cefalexina tras su administración intravenosa a la dosis de 2.5 mg/kg/6h durante un período de 24 horas

Los resultados de este estudio demuestran que, a excepción de lo observado en el animal 3, con este esquema de dosificación se obtienen mejores perfiles cinéticos que con el esquema monodosis (ver apartado 3.2, sección resultados). Esto es debido fundamentalmente a que se mejoran los tiempos de eliminación y los

volúmenes de distribución. Estos resultados cinéticos, se corresponden con los resultados observados a nivel farmacodinámico con un efecto antibacteriano muy superior al observado para el esquema de monodosis. Probablemente, el esquema de dosificación fraccionado/multidosis conduce a una mejor distribución tisular con lo que se consigue mejorar el equilibrio intra-DIS y, en consecuencia, aumentar la eficacia bactericida.

Sin embargo, es necesario explicar la falla observada en el animal 3. Este animal, a diferencia de los restantes integrantes del grupo, fue un conejo negro, por lo tanto cabe la explicación presentada en párrafos anteriores. En este animal no se observó respuesta antibacteriana, con lo cual podemos afirmar que tanto los buenos como los malos resultados cinéticos y dinámicos demuestran la fidelidad del modelo experimental desarrollado.

Es importante remarcar, que si aplicamos el predictor de eficacia aceptado para los antibióticos betalactámicos ($T > CIM$) en la comparación de las administraciones intravenosas, ambas resultarían similares, ($T > CIM$ de ambas 24 h), lo cual claramente no es cierto. Estos resultados reafirman nuestra hipótesis inicial: los predictores de eficacia carecen de robusticidad ya que no incorporan en su estimación las complejidades observadas in-vivo.

2.3.- Estudio de las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente, disposición plasmática y análisis cinético de cefalexina tras su administración intramuscular a dosis única de 10 mg/kg.

En este grupo experimental se observó una importante variabilidad (ver apartado 3.3, sección resultados). Por un lado tenemos el conejo 1, en el que se observa una rápida absorción con baja biodisponibilidad, alto Vd, baja Cmax, baja AUC y lenta eliminación. Este perfil cinético se ve reflejado en la respuesta antibacteriana: disminución logarítmica importante a las 1, 3 y 6 h post-administración, con recrecimiento significativo a la hora 9 seguido por una caída en el crecimiento bacteriano a las 24 h. Este perfil de actividad bactericida puede ser reflejo de diferencias en las áreas capilares que rodean los DIS; aquellos DIS que poseen mayor inhibición bacteriana tendrían una mayor área capilar. El alto volumen de distribución que se obtuvo en este animal podría deberse a cierto efecto de acumulación del antibiótico en el interior de los DIS con la consecuente mayor respuesta bactericida.

Por otro lado, tenemos el resto de los conejos de este grupo, cada uno con una particularidad cinética, pero todos con mayor biodisponibilidad y mejor respuesta bactericida. Es importante analizar un evento particular observado en los conejos 3 y 4, un Tmax a las 9 h post-administración. Al estudiar las curvas de inhibición durante todo el tratamiento, se puede observar que hasta la hora 9 post-administración el conteo bacteriano sólo disminuye levemente. Este último evento puede deberse a un aumento tardío en la concentración plasmática de cefalexina reflejando la lenta liberación del antimicrobiano desde el sitio de aplicación.

En conclusión, exceptuando al conejo 1 en el cual la eficacia antibacteriana fue controvertida, el resto de los animales, a pesar de sus diferencias cinéticas, respondieron muy bien al esquema de tratamiento aplicado. Es evidente que la vía de administración intramuscular determina una menor respuesta antibacteriana final, debido probablemente a una alteración en el proceso de absorción. Esto puede observarse comparando la reducción logarítmica del conteo bacteriano obtenido por esta vía respecto al obtenido tras la administración intravascular. Por otra parte, la lenta absorción observada está en consonancia con el mayor volumen de medicamento administrado con el esquema en monodosis. Es importante mencionar la sensibilidad del conejo a la administración intramuscular de fármacos (Shintani y col., 1967). La alta correlación entre el grado de irritación tisular y el volumen inyectado ha sido reportada (Steiness y col., 1978). Es evidente que el alto volumen inyectado intramuscularmente va en detrimento con el proceso de absorción; esto puede ser ratificado con el esquema fraccionado/multidosis donde mejora la biodisponibilidad de la droga al inyectar volúmenes más pequeñas (ver más adelante).

2.4.- Estudio de las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente, disposición plasmática y análisis cinético de cefalexina tras su administración intramuscular a la dosis de 2.5 mg/kg/6h durante un período de 24 horas.

En este grupo de experimental ocurrió algo similar que con el anterior grupo, donde encontramos buena respuesta cinético/dinámica en tres animales no siendo así en el restante (ver apartado 3.4, sección resultados). Esto último refiere al conejo 1, debido al perfil de distribución limitado no se genera respuesta bactericida; se observa una disminución máxima de 2 logaritmos en el crecimiento bacteriano a las 9 y 18 h. Los otros 3 animales al poseer una más amplia distribución, tuvieron una respuesta bactericida acorde. Cabe aclarar que en el conejo 2 se produjo un evento particular que podría deberse a una muy lenta absorción (reflejado por el valor de Tmax). La respuesta antibacteriana coincide con el perfil cinético evidenciando actividad bactericida recién a las 18 h (disminuyendo 6 logaritmos).

A partir de los resultados tanto cinéticos como dinámicos obtenidos en los animales 2, 3 y 4 se puede afirmar que este esquema de dosificación es más efectivo que el de monodosis, haciendo hincapié fundamentalmente en la mejor biodisponibilidad estimada para este tratamiento.

La mayor biodisponibilidad observada estaría reflejando la facilitación de los procesos de absorción a nivel del músculo esquelético cuando se administran pequeños volúmenes (Zuidema y col., 1994).

CONCLUSIONES GENERALES ETAPA 3

Se puede concluir que la validación del modelo experimental desarrollado con cefalexina (como representante de los antimicrobianos con cinética de killing bacteriano de tipo tiempo dependiente (McKellar y col., 2004) ha sido exitosa. Si bien hubo variabilidad entre los animales pertenecientes a cada esquema de tratamiento aplicado el modelo emuló la tiempo-dependencia del antimicrobiano. El modelo desarrollado permitió identificar la mejor respuesta para los tratamientos multidosis en comparación con los de monodosis. También permitió visualizar la menor respuesta bactericida asociada a los problemas de absorción del medicamento utilizado.

La variabilidad inter-animal observada fue la esperable para un modelo in vivo, donde se conjugan numerosas fuentes de variación, las cuales son ignoradas por los modelos in vitro. Las fuentes de variación más importantes que pudieron ser identificadas por el modelo desarrollado están relacionadas a las áreas capilares del sitio de acción y la concentración de proteínas plasmáticas. Resultando sus alteraciones en respuestas bacterianas disímiles en algunos casos y hasta nulas en otros. Sin embargo el modelo experimental desarrollado, donde el animal es sometido a una infección insulada y local de baja intensidad, permitió investigar las consecuencias fisiopatológicas de los procesos infecciosos sin afectar el bienestar animal.

3.- DISCUSION Y CONCLUSIONES PARCIALES ETAPA 4.

Validación del modelo desarrollado a través del análisis de la curva de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente en conejos tratados con ciprofloxacina, como representante del grupo de antimicrobianos con cinética de killing bacteriano concentración dependiente.

Para analizar los siguientes tratamientos, hay que recordar que ciprofloxacina, al igual que el resto de las fluoroquinolonas, es un antimicrobiano altamente liposoluble, que se distribuye ampliamente debido a que atraviesa fácilmente las membranas biológicas. De hecho para este grupo de antimicrobianos los volúmenes de distribución reportados superan el litro/kg. (Martinez y col., 2006) Asimismo, se clasifica como de cinética de muerte bacteriana concentración-dependiente. Lo que implica que la máxima eficacia clínica se correlaciona con la exposición de la bacteria al fármaco, de ahí que los predictores de eficacia son la relación AUC/CIM y Cmax/CIM. (McKellar y col., 2004)

3.1.- Estudio de las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente, disposición plasmática y análisis cinético de ciprofloxacina tras su administración intravenosa a dosis única de 30 mg/kg.

En este grupo de tratamiento se distinguen 3 animales (1,3 y 4) con respuesta bactericida similar y el restante (2) con un perfil claramente distinto (ver apartado 4.1, sección resultados). Los animales del primer grupo poseen, además de la similitud asociada a la actividad antibacteriana, un perfil de distribución similar. Sin embargo, un análisis de los perfiles de eliminación permite diferenciar al animal 1, que posee una eliminación significativamente más prolongada que los animales 3 y 4. Esta diferencia se refleja en el mayor AUC/CIM estimado para el animal 1. Es importante remarcar que aún cuando a simple vista las curvas inhibición del crecimiento bacteriano vs tiempo parecen similares, la observación detallada de los datos cinético/dinámicos demuestra que en este animal la actividad bactericida fue significativamente mayor en todos los DIS.

En cuanto a los otros dos animales (3 y 4) el AUC/CIM fue menor como consecuencia de la rápida eliminación, resultando en una menor actividad bactericida. Desde el punto de vista cualitativo, las diferencias en el comportamiento cinético/dinámico de ciprofloxacina en el animal 1, por un lado y los animales 3 y 4 por el otro se explica aplicando la ley de Fick (Brogioli y Vailati, 2001); en los animales 3 y 4 la disminución del tiempo de eliminación a valores menores a los requeridos para el completo equilibrio plasma/DIS (imprescindible para la máxima actividad bactericida del fármaco) impide que se evidencie la máxima actividad que el fármaco es capaz de provocar. Sin embargo, dado la característica concentración

dependencia de ciprofloxacina y el pico de concentración plasmática inicial provocado por la administración intravenosa (con el consecuente alto gradiente de concentración plasma/DIS), explica que en estos animales sea posible observar una respuesta bactericida significativa, aunque sub-máxima.

En el animal 2 se produjo otro fenómeno, el cual podría explicarse por el alto volumen de distribución. Este animal fue el único cuya cepa era color blanco; si tenemos en cuenta las diferencias mencionadas anteriormente en el nivel de proteínas plasmáticas de estos animales, nuevamente coincide que los animales blancos tienen alto volumen de distribución y los negros bajo. Al observar los resultados de la actividad bactericida de ciprofloxacina en este animal, se podría relacionar el alto volumen de distribución con una tendencia a distribuir el antimicrobiano de manera irregular dentro de los DIS. Por otro lado, estas diferencias también podrían reflejar una mayor área capilar en los DIS que tuvieron mejor respuesta antibacteriana. Entonces, los resultados observados en este animal podrían ser por la sumatoria de dos factores: bajo nivel de proteínas plasmáticas y áreas capilares que rodean los DIS desiguales.

En conclusión, a excepción del animal 2 se podría decir que en el resto de los animales se obtuvo una respuesta cinético-dinámica acorde al tipo de antimicrobiano en estudio; una disminución notoria del conteo bacteriano hasta las 6 h y recrecimiento a partir de la hora 9, lo que correspondería a la necesidad de la repetición de la dosis.

3.2.- Estudio de las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente, disposición plasmática y análisis cinético de ciprofloxacina tras su administración intravenosa a la dosis 7.5 mg/kg/6h durante un período de 24 horas

En este grupo de tratamiento los valores cinéticos que arrojó el esquema de administración aplicado son variados, pudiendo diferenciarse 2 grupos (ver apartado 4.2, sección resultados). Un grupo estaría conformado por los conejos 1 y 2 con bajos volúmenes de distribución y altas C_{max} y AUC, lo que conduce a altos índices AUC/CIM. El otro grupo estaría formado por los conejos 3 y 4 con perfiles opuestos al grupo anterior, altos volúmenes de distribución y bajas C_{max} y AUC, por ende bajos índices AUC/CIM.

Es evidente que este esquema de dosificación no conduce a perfiles cinéticos/dinámicos eficaces como el esquema de monodosis, este evento es esperable considerando el tipo de cinética de killing bacteriano de ciprofloxacina. Al analizar las curvas bactericidas no se identifica un patrón definido como lo tenía este mismo esquema con cefalexina, siendo la reducción logarítmica variable y mucho menor. Esta disparidad refleja la dependencia de la concentración en la cinética de muerte bacteriana; las dosis bajas conducen a un estado estacionario muy bajo, insuficiente para causar la inhibición del crecimiento bacteriano en la totalidad de los DIS implantados. Este resultado es importante y refleja que el modelo desarrollado es lo suficientemente robusto para identificar la cinética de muerte bacteriana del antimicrobiano en estudio (ver diferencias con el antimicrobiano tiempo dependiente cefalexina).

3.3.- Estudio de las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente, disposición plasmática y análisis cinético de ciprofloxacina tras su administración intramuscular a dosis única de 30 mg/kg.

Este esquema de administración mostró una muy baja biodisponibilidad (ver apartado 4.3, sección resultados). Este hecho puede ser debido a la composición del medicamento utilizado. La pobre biodisponibilidad de los formulados clásicos de ciprofloxacina base, conteniendo lactato como solubilizante y ácido clorhídrico como estabilizante, están ampliamente reportados (Park y col., 2002) (Varanda y col., 2006) (Schaefer y Michaelis, 1994). De hecho, se han presentado numerosas patentes de formulaciones con lactatos saponificados que claman un aumento importante de la biodisponibilidad (Oficina española de Patentes y Marcas, 1989). La baja biodisponibilidad de la ciprofloxacina base contenida en la formulación tras la administración intramuscular es consecuencia de su secuestro/atrapamiento en el lugar de aplicación. Este atrapamiento se incrementa cuando se inyectan grandes volúmenes de vehículo, que son requeridos a efectos de alcanzar la dosis terapéutica, debido a la pobre solubilidad de ciprofloxacina base y a la alta irritación tisular que inducen los lactatos. La baja biodisponibilidad observada en este estudio condujo, como era esperable, a concentraciones plasmáticas muy bajas las que se reflejaron en una eficacia pobre y variable. Los valores AUC/CIM estimados estuvieron bastante por debajo del valor recomendado para las fluoroquinolonas en un contexto de erradicación bacteriana. (Forrest y col., 1993).

En el presente estudio, si bien no funcionó este tratamiento por la baja biodisponibilidad del principio activo, fue posible identificar inhibición bacteriana

cuando los valores de AUC/CIM fueron menores a 120 (valor mínimo recomendado por (Forrest y col., 1993). Con lo cual nos despierta la inquietud de revisar, mejorando la biodisponibilidad del compuesto, las dosis terapéuticas recomendadas para ciprofloxacina en conejos aplicando el modelo desarrollado en esta tesis.

3.4.- Estudio de las curvas de crecimiento bacteriano en el interior de los dispositivos implantados subcutáneamente, disposición plasmática y análisis cinético de ciprofloxacina tras su administración intramuscular a la dosis 7.5 mg/kg/6h durante un período de 24 horas

En este estudio se evidenció una importante actividad bactericida (ver apartado 4.4, sección resultados). Estos resultados fueron inesperados para un antibiótico con cinética de killing bacteriano concentración dependiente. Sin embargo al analizar las curvas de disposición plasmática de los animales experimentales, se observó un significativo aumento en la biodisponibilidad. Este aumento de la biodisponibilidad es probablemente consecuencia de los menores volúmenes inyectados (1/4 del volumen inyectado en el estudio anterior), lo cual disminuye la reacción tisular local y por ende el atrapamiento del principio activo. De todas maneras, la dificultad para absorberse del compuesto utilizado es evidente, ya que a pesar de haber mejorado la biodisponibilidad, la misma sigue siendo baja.

El análisis de las curvas de muerte bacteriana integradas con las curvas de disposición plasmáticas demuestra la correlación alta C_{max}/CIM y AUC/CIM con importante reducción bacteriana. Dicho evento marca, a pesar de las bajas

concentraciones plasmáticas obtenidas, la concentración dependencia de la eficacia de ciprofloxacina.

Con estos resultados y reforzando lo mencionado en el estudio anterior, podemos concluir que nuestro modelo experimental es aplicable a la evaluación de las dosificaciones recomendadas para los diferentes antimicrobianos.

CONCLUSIONES GENERALES ETAPA 4

Este conjunto de estudios muestra una mayor variabilidad que la observada en los estudios utilizando cefalexina. Esto es probablemente consecuencia de las características fisicoquímicas de ciprofloxacina (pobre solubilidad, baja estabilidad) (Fallati y col., 1994) lo que obliga al uso de formulaciones complejas. Cuando comparamos los esquemas de administración endovenosa se puede observar que la respuesta cinético-dinámica se ajustó mejor al tratamiento en monodosis, lo cual es esperable para un antimicrobiano tipo concentración dependiente. Sin embargo, cuando comparamos los tratamientos por vía intramuscular, la variabilidad fue mucho mayor y las respuestas cinético-dinámicas no concuerdan con la cinética de killing bacteriano del antimicrobiano en estudio. Dicho evento se puede explicar por los inconvenientes en la absorción que tuvo esta molécula relacionado a los altos volúmenes de inyección requeridos, especialmente para la administración monodosis.

DISCUSION Y CONCLUSIONES GENERALES

El modelo experimental desarrollado en esta tesis puede ser considerado como una herramienta novedosa y de gran valor para los estudios de integración/modelamiento farmacocinético/farmacodinámico (PK/PD). Son numerosas las causas que justifican dicha afirmación y fueron presentadas previamente, sin embargo es necesario recalcar las fortalezas y debilidades que posee el modelo desarrollado.

En primera instancia, cabe resaltar la importancia de que sea un modelo in vivo y que el mismo se haya desarrollado con animales sanos, no afectando el bienestar de los mismos. Los modelos animales utilizados hasta el momento se caracterizan por provocar procesos infecciosos graves, utilizando dispositivos de fluido tisular abiertos cargados con bacterias patógenas (Greko y col., 2003) en algunos casos y en otros la inyección intramuscular de inóculos bacterianos (Vogelman y col., 1988; Fantin y col., 1991; Moffie y col., 1993). En estos modelos los análisis cinético-dinámicos arrojaban resultados compatibles con un proceso infeccioso grave quedando sin efecto para aquellas infecciones menos severas, que de hecho son las más comunes en la práctica clínica y están caracterizadas por una alta tasa de resolución espontánea con ausencia de severas alteraciones en los parámetros clínicos.

En los últimos años ha habido un gran avance en lo que respecta al bienestar animal para el cuidado y uso de los animales de laboratorio, obligando a los investigadores a repensar sus métodos de estudio. Además de mejorar las condiciones de hábitat de los animales, se debe pensar en el reemplazo, dentro de las posibilidades de los

procedimientos experimentales, de aquellas prácticas nocivas por otras más inocuas para el animal. En este contexto el modelo experimental presentado reemplaza como método de estudio a las infecciones experimentales severas y generalizadas por un dispositivo de implantación subcutánea (DIS), en el cual la infección se encuentra contenida permitiendo el pasaje únicamente de droga libre sin inducir procesos infecciosos graves y/o septicemias.

También hay que tener en cuenta que la mayoría de los modelos in vivo de uso actual requieren la inducción de neutropenia en los animales experimentales (Drusano y col., 1993). Esto anula las defensas del huésped y, por lo tanto las conclusiones extraídas de su aplicación no son directamente extrapolables a las situaciones clínicas, tanto en animales como en seres humanos, en la mayoría de las cuales la neutropenia está ausente. Por ejemplo, Vogelmann y col., en 1988 describieron un modelo experimental con animales neutropénicos que se utilizó durante muchos años, en éste se evaluaban diferentes antimicrobianos con múltiples esquemas de dosificación en animales infectados mediante la inoculación intramuscular de microorganismos en el miembro posterior. Para realizar la evaluación farmacodinámica, los animales eran sacrificados y se procedía a realizar el conteo bacteriano a partir de homogeneizados de los músculos inoculados. Este tipo de modelo si bien fue una herramienta muy valiosa para el desarrollo de las técnicas de modelamiento PK/PD in vivo, impide hacer un seguimiento bactericida temporal en el mismo animal. A su vez tanto los valores cinéticos como dinámicos son estimados en un contexto de neutropenia, lo que no sería extrapolable para todas las infecciones de animales o humanos. Es esperable que al inocular microorganismos en animales que no poseen mecanismos de defensa naturales

rápidamente se produzca una septicemia, por lo cual, los resultados no serían compatibles con una infección localizada sino con los de una infección grave generalizada.

Por los resultados expuestos en la presente tesis, se puede afirmar la utilidad del modelo desarrollado para el seguimiento bactericida temporal de cualquier tratamiento antimicrobiano, con la ventaja que los animales utilizados no padecen un proceso infeccioso grave. Por esto último, nuestro modelo serviría para discernir las causas de las fallas de los tratamientos antimicrobianos, discriminando si la falla está asociada a la respuesta fisiopatológica del individuo en tratamiento, al microorganismo causante de la infección, o a las características cinético/dinámicas del medicamento antimicrobiano utilizado.

Cabe destacar que los estudios de las fallas en los tratamientos antimicrobianos, en general, hacen hincapié en los mecanismos de resistencia al antimicrobiano que pueden desarrollar los microorganismos y a la calidad del proceso fisiopatológico con que responde el organismo ante la injuria (insuficiente respuesta inmune). Sin embargo, casi no se señalan las diferencias naturales, inter e intraespecie, que poseen los organismos superiores que podría conducir al fracaso del tratamiento. Por ejemplo, en los resultados obtenidos en los diferentes estudios que conforman esta tesis se puede observar que la variabilidad en la afinidad de las proteínas plasmáticas en las subpoblaciones que conforman una raza puede llevar a resultados farmacocinéticos y farmacodinámicos completamente opuestos. Es importante remarcar que en los últimos años ha surgido una interesante controversia en relación a los estudios de fármacos utilizando perros de raza Beagle (la mayoría de los estudios de fase II en medicina humana), dado que se han reportado dentro

de esta raza subpoblaciones (cepas) que poseen diferencias en los valores de clearance hepático superiores al 250 %, esto ha disparado una importante discusión acerca de valor real de las conclusiones surgidas de los diferentes estudios realizados hasta la fecha (Fleischer y col., 2008; Toutain y col., 2010).

Un modelo experimental que ha atraído cierta atención para los estudios de farmacodinámica de antimicrobianos es el modelo de cajas tisulares (Clarke, 1989). Las cajas tisulares son dispositivos perforados, en su mayoría implantados subcutáneamente que se utilizan con la intención de que contenga una infección. El mayor inconveniente que suscita este tipo de modelo es que los microorganismos se escapan del dispositivo provocando rápidamente septicemia en el animal, encontrándonos nuevamente frente a una infección generalizada. Sin embargo, la caja en sí misma representa un cuerpo extraño, y de hecho, este tipo de modelo ha sido utilizado para estudiar diversos aspectos de las infecciones asociadas a implantes (Zimmerli, 1993). El dispositivo de implantación subcutánea (DIS) desarrollado en la presente tesis, permitiría también el estudio de infecciones asociadas a implantes debido a que se podría introducir un trozo de material implantable en el interior de los DIS junto con los microorganismos en estudio y el caldo de cultivo. Esto último permitiría realizar este tipo de estudio sin provocar la septicemia que se manifiesta con la utilización de las cajas tisulares perforadas.

En este contexto, es importante remarcar que en algunos DIS de nuestros animales experimentales se observó la formación de biofilm. Para el estudio del mismo, los DIS fueron vaciados, lavados con buffer y vortexeados durante 2 min en solución fisiológica. Por último se realizó el conteo bacteriano a partir de la solución. Todos ellos tuvieron resultados por encima de 1×10^4 ufc/ml lo que indica que sobre la

pared de los DIS comenzaba la formación de biofilm. Esto transforma al modelo experimental presentado en una herramienta válida tanto para el estudio de la sensibilidad antimicrobiana de los biofilm como para el estudio de la cinética de formación de éstos sobre la superficie de los implantes.

En la clínica se considera a los biofilms responsables de la mayoría de las infecciones recidivantes o aquellas asociadas a implantes (Meneses y Landoni, 2012). Actualmente es ampliamente aceptado que los biofilms son causantes de muchas enfermedades infecciosas bacterianas, todas ellas caracterizadas por su difícil erradicación y carácter recidivante (Madhu Sharma y Yadav, 2008). Los biofilms muestran una sorprendente capacidad para resistir a los antibióticos, sin tener ningún mecanismo obvio de resistencia a los mismos. Esta es la paradoja esencial de las infecciones crónicas que en la mayoría de los casos, se acompañan de la formación de biofilms y parece indicar la fuente del problema (Monds y O'Toole 2009). En este contexto, se observó que los biofilms generalmente no limitan la penetración de los antibióticos (Walters y col., 2003), aún cuando forman una barrera para varios componentes del sistema inmune (Jesaitis y col., 2003; Leid y col., 2002; Vuong y col., 2004), por lo cual no sería la resistencia bacteriana adquirida a los antibióticos propiamente dicha la causa de su alta resistencia, sino que esta estaría relacionada a la incapacidad de los antimicrobianos de interactuar con sus sitios de acción en el interior de la célula bacteriana, así como a la baja penetración de los componentes del sistema inmune.

Por su parte, Lewis en el 2010 introdujo el concepto de células persistentes refiriéndose a los trabajos de Joseph Bigger de 1944 (Bigger, 1944) en los cuales se reportó la presencia de colonias de estafilococos sobrevivientes al finalizar los

tratamientos con penicilina. Al reinocular éstas colonias resultaban en un cultivo sensible a penicilina pero que luego de la exposición al antibiótico formaba nuevamente pequeñas subpoblaciones que Bigger denominó "persistentes" para diferenciarlos de mutantes resistentes. Como sabemos ahora, todos los antibióticos son ineficaces frente a las células persistentes.

Lewis relaciona a las células persistentes y a la formación de biofilm con los fracasos terapéuticos de las infecciones crónicas. Estudios de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* mostraron la presencia de una pequeña subpoblación de células completamente tolerantes a antibióticos (Brooun y col., 2000; Spoering y Lewis, 2001). El redescubrimiento de células persistentes en los biofilms renovó el interés en su estudio; los avances en el estudio de las células persistentes en la última década ha conducido a la comprensión de que si bien son células inactivas su función es eternizar la población bacteriana a la que pertenecen (Balaban y col., 2004; Shah y col., 2006)

Como se mencionó anteriormente, la mayor parte de las células en el biofilm en realidad son susceptibles a la muerte por antibióticos, aun cuando la concentración inhibitoria mínima de la bacteria en estado de biofilm es mucho mayor a la correspondiente al estado planctónico; sólo una pequeña fracción de bacterias persistentes permanecen vivas (Spoering y Lewis, 2001). Por lo tanto, establecer la causalidad potencial entre persistentes e insuficiencia terapéutica no es trivial, ya que estas células forman una pequeña subpoblación con un fenotipo temporal, lo que impide introducirlas en los modelos animales de infección que han sido reportado hasta la fecha (Lewis, 2010).

La aplicación periódica de dosis altas de antibióticos bactericidas conduce a la selección de cepas productoras de bacterias persistentes (Moyed y Bertrand, 1983; Wolfson y col., 1990). Esto es precisamente lo que ocurre en el curso del tratamiento de las infecciones crónicas en el paciente, el cual se expone periódicamente a dosis altas de antibióticos. Es evidente que la aplicación de este tipo de tratamiento proporciona cierto alivio al disminuir la cantidad de patógenos, pero no elimina la infección, de hecho, la perpetúa.

Por nuestra parte, así como sostenemos que el modelo experimental diseñado en ésta tesis puede servir para el estudio de los biofilms, por consecuencia directa también podría serlo para el estudio de las bacterias persistentes. Teniendo en cuenta que los antimicrobianos son ineficaces contra este tipo de bacterias, Lewis propone varias alternativas de tratamiento como ser el desarrollo de profármacos que puedan ingresar a la célula y activarse en su interior ó la combinación de un antibiótico con un compuesto que deshabilite la función de mantenimiento de las bacterias persistentes, entre otros. Es importante remarcar que éste novedoso campo de investigación está en crecimiento y el modelo experimental presentado en esta tesis podría ser aplicable, teniendo en cuenta la imposibilidad de utilizar los modelos experimentales clásicos desarrollados hasta la fecha.

Es necesario enunciar también la debilidad más importante a tener en cuenta en este modelo: el tiempo necesario para que la concentración de antimicrobiano en plasma llegue a un estado de equilibrio con la concentración del mismo en el interior del DIS y en consecuencia, pueda evidenciar su capacidad bactericida máxima. En este contexto, habría que evaluar los siguientes factores que, al influir en el tiempo

de equilibrio influyen en la capacidad del modelo experimental para emular la interacción antimicrobiano/patógeno in vivo:

- Formulación del principio activo (medicamento)
- Afinidad de unión del antimicrobiano a proteínas plasmáticas
- Concentración de proteínas plasmáticas de la especie en estudio
- Relación tiempo de equilibrio/velocidad de eliminación del antimicrobiano

Todos estos puntos se citan debido a que su importancia se hizo evidente en los estudios de desarrollo realizados.

El primer factor a considerar surge de los estudios de validación utilizando ciprofloxacina. En este caso el medicamento administrado contenía excipientes ácidos (láctico y clorhídrico) otorgándole a la formulación un pH ácido (3,2-4.5) lo que provocó, especialmente cuando se administraban volúmenes mayores a 1 ml una injuria tisular que, aun cuando no provocaba signos de inflamación local o disconfort en el animal experimental, atrapaba la molécula en el sitio de inyección, reduciendo su biodisponibilidad y por ende alargando el tiempo de equilibrio plasma/DIS.

El medicamento utilizado (Ciriax 200[®], laboratorios Roemmers) fue el único inyectable disponible en el mercado nacional. Una posible solución podría ser el uso de formulados conteniendo ácido láctico saponificado como solubilizante. De hecho la oficina de Patentes y Marcas del Reino de España ha publicado una monografía con datos comparativos entre la capacidad de injuria tisular de las formulaciones comunes y las que contienen lactatos saponificados, demostrando

claramente la menor capacidad irritante tisular de estas últimas (Oficina española de Patentes y Marcas, 1989) . Desafortunadamente estas formulaciones no se encuentran, a la fecha, disponibles en nuestro país.

El segundo factor a considerar, es la afinidad de unión del antimicrobiano a proteínas plasmáticas así como, la concentración de proteínas plasmáticas de la especie experimental utilizada. Estas características del fármaco y/o paciente tienen una marcada influencia en el perfil de distribución del antimicrobiano. Una alta afinidad del antimicrobiano a las proteínas plasmáticas, juntamente con una alta concentración de las mismas, repercutirá en el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio plasma/DIS. Recordemos que solo la fracción libre de la droga es capaz de acceder al DIS; desafortunadamente la sensibilidad del método de cuantificación utilizado en la presente tesis no fue suficiente para medir la concentración de droga libre en el interior del DIS, por lo cual sería recomendable utilizar un método analítico lo suficientemente sensible que permita manipular este parámetro, como la espectrofotometría de masa. Este equipamiento no está al alcance del grupo de investigación debido a su alto costo económico y a los requerimientos de infraestructura que un equipo de alta sofisticación requiere.

Finalmente, la relación tiempo de equilibrio/velocidad de eliminación del antimicrobiano que es, probablemente, el punto crítico no solo para el presente modelo experimental sino para cualquier tratamiento que incluya la acción antimicrobiana en el interior de un compartimiento separado del resto del organismo por algún tipo de barrera (ej. articulación).

Consideremos una zona anatómica separada del resto del organismo por una barrera (real o virtual); si el tiempo de equilibrio entre la sangre y el compartimiento

es mayor que la velocidad de eliminación del fármaco el equilibrio nunca tendrá lugar. En este contexto, es fundamental considerar el área capilar y su alteración en estados patológicos así como, las modificaciones en el tiempo de eliminación del fármaco en estudio. Por ejemplo, Benkhelifa y col., en 1997 y Ramon y col., en 1994 describieron transportadores transepiteliales intestinales en conejos que tienen entre sus sustratos a cefalexina y ciprofloxacina. Esta particularidad de especie puede influir en la velocidad de eliminación del antimicrobiano si, por ejemplo, el tránsito intestinal se encuentra aumentado.

Teniendo en cuenta cada uno de estos factores se minimizaría la variabilidad observada aumentando la calidad de los resultados obtenidos.

Estudios recientes publicados por D'Agata y col., proponen modelos matemáticos de simulación para estudiar la eficacia de distintos esquemas de administración de antimicrobianos en la prevención de la resistencia bacteriana. En sus estudios estos autores incorporaron una serie de factores, entre ellos, la actividad del sistema inmune, grado y tiempo de exposición a los antimicrobianos y la adquisición de genes de resistencia. El modelo identifica las estrategias clave que limitan la aparición y propagación de bacterias resistentes. En concreto, las simulaciones matemáticas propuestas D'Agata y col., demostraron que el inicio temprano de la terapia antimicrobiana y la terapia combinada con dos antibióticos evitan la aparición de bacterias resistentes, mientras que las terapias cortas y la administración secuencial de antibióticos promueven la aparición de las mismas.

Como se mencionó anteriormente, durante años el enfoque principal en la evaluación de la causalidad de los fracasos terapéuticos ha sido el estudio de los

mecanismos de resistencia bacteriana. D'Agata y col. en sus modelos matemáticos indican que si se incorporan nuevas estrategias terapéuticas, entre ellas, inicio temprano del tratamiento o aplicación de terapias combinadas, se aumenta la probabilidad de éxito terapéutico tanto para cepas bacterianas resistentes como sensibles. Con lo cual, indirectamente se podría concluir que no es la resistencia bacteriana el principal causal de fracaso terapéutico sino, las estrategias terapéuticas que se utilizan. El modelo desarrollado en esta tesis podría servir para evaluar in vivo los modelos matemáticos de simulación propuestos por D'Agata y col. Por otra parte, Udekwu y col., en el 2009 estudiaron la relación funcional entre la densidad bacteriana y la eficacia de los antibióticos, conocido comúnmente como efecto inóculo. En sus ensayos estos autores evaluaron in vitro la relación funcional entre el porcentaje de muerte y valor de CIM de seis clases de antibióticos frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 con diferentes densidades de inóculo.

El principal resultado que arrojaron estos estudios fue que la densidad del inóculo determina la eficacia de todos los antibióticos estudiados; con inóculos de alta densidad bacteriana se observan significativamente mayores valores de CIM. Por ejemplo, con densidades menores de 10^6 ufc/ml las CIM estimadas parecen ser relativamente independientes de la densidad del inóculo, consistente con lo anticipado por los protocolos estandarizados de CLSI. Sin embargo, por encima de un determinado umbral de densidad bacteriana (10^7 ufc/ml) la CIM se transforma en un parámetro dependiente del número de bacterias.

Teniendo en cuenta que actualmente todos los laboratorios de microbiología del mundo (siguiendo los protocolos del CLSI) estiman los valores de CIM utilizando inóculos de baja densidad (10^5 ufc/ml) la sensibilidad informada no reflejaría la

situación en presencia de infecciones con inoculos de alta densidad (aclarando que en la práctica clínica, la densidad bacteriana en los sitios de infección supera con creces 10^6 ufc/ml).

Si consideramos que los predictores de eficacia aceptados en la actualidad, tanto para antimicrobianos con cinética de killing tiempo dependiente como concentración dependiente, utilizan el valor de CIM como surrogante farmacodinámico para su estimación, es necesario recapacitar sobre la calidad de estos parámetros de predicción y las consecuencias de su aplicación en el diseño de regímenes de dosificación.

Todos los modelos experimentales asumen que la infección es homogénea, y que la densidad de las bacterias y la concentración del antibiótico son las mismas en todos los sitios infectados (Udekwu y col., 2009). Sin embargo, la realidad es diferente; en un huésped infectado las densidades bacterianas en los diferentes focos no son homogéneas así como, tampoco la distribución del antimicrobiano. En consecuencia, el antibiótico puede eliminar fácilmente los focos con densidades bacterianas más bajas pero no aquellos con densidades mayores, las que podrían perpetuarse en el organismo infectado.

Por último, Udekwu y col., citan la ausencia de modelos in vivo que exploren la relación funcional entre los efectos de la densidad bacteriana (inóculo) y la eficacia terapéutica de los tratamientos. Si bien en el modelo experimental presentado se aplicó un único inóculo podría adaptarse de manera tal de colocar diferentes densidades bacterianas en los diferentes DIS implantados en un mismo animal experimental, lo que permitiría la evaluación integral de la relación densidad de inóculo/ eficacia antimicrobiana.

Como mencionamos previamente, en las últimas décadas la explicación de los fracasos terapéuticos de los procesos infecciosos estuvo enfocada, exclusivamente, en los mecanismos de resistencia bacteriana. Es indiscutible el avance científico en este terreno, sin embargo condujo a que el estudio del proceso infeccioso, como entidad, pasara a un segundo plano. Esto mismo sucede muy a menudo en diferentes aspectos en el mundo de las ciencias biológicas, donde se profundiza en procesos insignificantes para lo que sería el contexto global en el cual suceden los fenómenos biológicos, parafraseando “el árbol tapa el bosque”.

En resumen, el modelo experimental presentado en el presente trabajo de tesis resulta adaptable para el estudio de la mayoría de los componentes del proceso infeccioso, como ser formación de biofilm, persistencia bacteriana, efecto inóculo, etc. A su vez es un modelo que ofrece la posibilidad de trabajar con animales sanos sin producir septicemia y respetando el bienestar de los mismos.

V - BIBLIOGRAFÍA

1. Akaike, H. "A new look at the statistical identification model." *IEEE Trans. Auto Control*. 1974; 19: 716-723.
2. Aliabadi, F. S., Landoni, M. F. and Lees, P. "Pharmacokinetics (PK), pharmacodynamics (PD), and PK-PD integration of danofloxacin in sheep biological fluids". *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47(2): 626-35.
3. AliAbadi, F. S. and Lees P. "Antibiotic treatment for animals: effect on bacterial population and dosage regimen optimisation." *Int J Antimicrob Agents*. 2000; 14(4): 307-13.
4. Aliabadi, F. S. and Lees, P. "Pharmacokinetic–pharmacodynamics integration of danofloxacin in the calf ". *Research in Veterinary Science*. 2003; 74: 247–259.
5. Ambrose, P.G., Owens, R.C. Jr., Garvey, M.J., Jones, R.N. "Pharmacodynamic considerations in the treatment of moderate to severe pseudomonal infections with cefepime." *J Antimicrob Chemother*. 2002; 49(3): 445-53.
6. American Academy of Pediatrics and American Academy of Family Physicians. "Diagnosis and management of acute otitis media." *Pediatrics* 2004; 113(5): 1451-65.

7. Anderson, B. H., Firth E.C, Whittam, T. "The disposition of gentamicin in equine plasma, synovial fluid and lymph". *J Vet Pharmacol Ther.* 1995; 18(2): 124-31.
8. Andes,D., Anon,J., Jacobs, M.R.,Craig, W.A. "Application of pharmacokinetics and pharmacodynamics to antimicrobial therapy of respiratory tract infections." *Clin Lab Med.* 2004; 24(2): 477-502.
9. Andes,D. and Craig,W.A. "Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: a critical review." *Int J Antimicrob Agents.* 2002; 19(4): 261-8.
10. Anon, J.B., Jacobs, M.R., Poole, M.D., Ambrose, P.G., Benninger, M.S., Hadley, J.A., Craig, W.A. "Antimicrobial treatment guidelines for acute bacterial rhinosinusitis." *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004; 130(1 Suppl): 1-45.
11. Aramayona, J. J., Mora, J., Fraile, L. J., Garcia, M. A., Abadia, A. R., Bregante, M. A. "Penetration of enrofloxacin and ciprofloxacin into breast milk, and pharmacokinetics of the drugs in lactating rabbits and neonatal offspring." *Am J Vet Res.* 1996; 57(4): 547-53.
12. Balaban, N. Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., Leibler, S. "Bacterial persistence as a phenotypic switch." *Science* 2004; 305(5690): 1622-5.

13. Benkhelifa S., Decroix M-O., Philippe A., Huneau, J-F., Tome´,D., Chaumeil J-C. "Characteristics of Cephalexin transport across isolated rabbit ileum." *International Journal of Pharmaceutics*. 1997; 159: 115–125.
14. Bergan, T. "Pharmacokinetics of beta-lactam antibiotics." *Scand J Infect Dis Suppl*. 1984; 42: 83-98.
15. Bigger, J. "Treatment of staphylococcal infections with penicillin." *Lancet*. 1944; 244: 497–500.
16. Bowker, K.E., Rogers, C., Wootton, M., MacGowan, A.P. Pharmacodynamics of gemifloxacin. Abstracts of the 40th Interscience. Conf Antimicrob Agents Chemother. 2000; Toronto ASM, A-300.
17. Brock, T. and Madigan. M. *Microbiología*. 1993. Prentice Hall Hispanoamérica S. A. México.
18. Brogioli, D. and Vailati, A. "Diffusive mass transfer by nonequilibrium fluctuations: Fick's law revisited." *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*. 2001; 63(1 Pt 1): 012105.
19. Brooun, A., Liu, S., Lewis, K. "A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44(3): 640-6.

20. Cars, O. "Pharmacokinetics of antibiotics in tissues and tissue fluids: a review." *Scand J Infect Dis Suppl.* 1991; 74: 23-33.
21. Cazabon, E. P. I. Rastogi, R.K.; Laukner, F.B.; Ali, B.A. "Some haematological values in rabbits from subtropical Trinidad, West Indies." 2000; *World Rabbit Science.* ICTA. UPV.
22. Clarke, C. R. "Tissue-chamber modeling systems--applications in veterinary medicine." *J Vet Pharmacol Ther.* 1989; 12(4): 349-68.
23. Cleeland, R. and Squires, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. *Antibiotics in laboratory medicine.* L. (Ed, V.) Williams & Wilkins. 1991 Baltimore/London: pp. 739-786.
24. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 21st informational supplement. CLSI document M100-S21, 2011. Wayne, PA, USA.
25. Colwell, R.R. "Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy." *J Infect Chemother.* 2000; 6(2): 121-5.
26. Craig, W.A. "Qualitative susceptibility tests versus quantitative MIC tests." *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1993;16(3): 231-6.

27. Craig, W.A. "Antimicrobial resistance issues of the future." *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1996; 25(4): 213-7.
28. Craig, W.A. "The pharmacology of meropenem, a new carbapenem antibiotic." *Clin Infect Dis.* 1997; 24 Suppl 2: S266-75.
29. Craig, W.A. "Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men." *Clin Infect Dis.* 1998; 26(1): 1-10; quiz 11-2.
30. Craig, W.A. "Basic pharmacodynamics of antibacterials with clinical applications to the use of beta-lactams, glycopeptides, and linezolid." *Infect Dis Clin North Am.* 2003; 17(3): 479-501.
31. Craig, W. A. and Andes D. "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibiotics in otitis media." *Pediatr Infect Dis J.* 1996; 15(3): 255-9.
32. CVMP. "Guideline for the determination of efficacy for veterinary medicinal products containing antimicrobial substances." 2002; EMEA, European agency for evaluation of medicinal products.
33. D'Agata E.M.C, Dupont-Rouzeyrol. M., Magal P, Olivier D, Ruan.S. "The Impact of Different Antibiotic Regimens on the Emergence of Antimicrobial-

ResistantBacteria."PLoS ONE.2008;3(12):e4036.doi:10.1371/journal.pone.0004036.

34. Dagan,R. "Achieving bacterial eradication using pharmacokinetic/pharmacodynamic principles." *Int J Infect Dis.* 2003; 7 Suppl 1: S21-6.
35. Davis, J. L., Salmon, J. H., Papich, M. G. "Pharmacokinetics and tissue fluid distribution of cephalexin in the horse after oral and i.v. administration." *J Vet Pharmacol Ther.* 2005; 28(5): 425-31.
36. den Hollander, J. G., Fuursted, K., Verbrugh, H. A., Mouton, J. W. "Duration and clinical relevance of postantibiotic effect in relation to the dosing interval." *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42(4): 749-54.
37. Drusano, G.L., de Jongh, C., Newman, K., Joshi, J. Wharton, R., Moody, M.R. Schimpff, S.C. "Moxalactam and piperacillin: a study of in vitro characteristics and pharmacokinetics in cancer patients." *Infection.*1985; 13(1): 20-6.
38. Drusano,G.L., Johnson,D.E; Rosen,M. Standiford,H.C."Pharmacodynamics of a fluoroquinolone antimicrobial agent in a neutropenic rat model of *Pseudomonas sepsis.*" *Antimicrob Agents Chemother.*1993; 37(3): 483-90.

39. Drusano, G.L., Ryan, P.A., Standiford, H.C., Moody, M.R., Schimpff, S.C.
"Integration of selected pharmacologic and microbiologic properties of three new beta-lactam antibiotics: a hypothesis for rational comparison." *Rev Infect Dis.* 1984; 6(3): 357-63.
40. Ensink, J.M., Klein, W.R., Mevius, D.J., Klarenbeek, A., Vulto, A.G. "Bioavailability of oral penicillins in the horse: a comparison of pivampicillin and amoxicillin." *J Vet Pharmacol Ther.* 1992; 15(3): 221-30.
41. EUCAST. "Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents." *Clinical microbiology and infection* 2000; 6: 503-508.
42. Evans. "Plasma Albumin Measurements in New Zealand White Rabbits." *World Rabbit Science.* 1994; 2 (1): 23-27.
43. Fallati C., Ahumada A., Manzo R. "El Perfil de Solubilidad de la Ciprofloxacina en Función del pH." *Acta Farm. Bonaer.* 1994; 13 :73–77.
44. Fantin, B., Leggett, J., Ebert, S., Craig, W.A. "Correlation between in vitro and in vivo activity of antimicrobial agents against gram-negative bacilli in a murine infection model." *Antimicrob Agents Chemother.* 1991; 35(7): 1413-22.

45. Fine, M.J., Auble, T.E., Yealy, D.M., Hanusa, B.H., Weissfeld, L.A., Singer, D.E., Coley, C.M., Marrie, T.J., Kapoor, W.N. "A prediction rule to identify low-risk patients with community-acquired pneumonia." *N Engl J Med.* 1997; 336(4): 243-50.
46. Firsov, A.A., Vostrov, S.N., Kononenko, O.V., Zinner, S.H., Portnoy, Y.A. "Prediction of the effects of inoculum size on the antimicrobial action of trovafloxacin and ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in an in vitro dynamic model." *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(3): 498-502.
47. Fleischer, S., Sharkey, M., Mealey, K. Ostrander, E.A. Martinez, M. "Pharmacogenetic and metabolic differences between dog breeds: their impact on canine medicine and the use of the dog as a preclinical animal model." *Aaps J.* 2008; 10(1): 110-9.
48. Forrest, A., Nix, D.E., Ballou, C.H., Goss, T.F., Birmingham, M.C., Schentag, J.J. "Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients." *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; 37(5): 1073-81.
49. Frimodt-Moller, N. "How predictive is PK/PD for antibacterial agents?" *Int J Antimicrob Agents.* 2002; 19(4): 333-9.
50. Gibaldi M, Perrier, D. *Pharmacokinetics.* 2nd ed. 1982, New York.

51. Gladue, R.P., Bright, G.M., Isaacson, R.E., Newborg, M.F. "In vitro and in vivo uptake of azithromycin (CP-62,993) by phagocytic cells: possible mechanism of delivery and release at sites of infection." *Antimicrob Agents Chemother.* 1989; 33(3): 277-82.
52. Grasso, S., Meinardi, G., de Carneri, I., Tamassia, V. "New in vitro model to study the effect of antibiotic concentration and rate of elimination on antibacterial activity." *Antimicrob Agents Chemother.* 1978; 13(4): 570-6.
53. Greko, C., Finn, M., Ohagen, P., Franklin, A., Bengtsson, B. "A tissue cage model in calves for studies on pharmacokinetic/pharmacodynamic interactions of antimicrobials." *Int J Antimicrob Agents.* 2003; 22(4): 429-38.
54. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Eighth Edition. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Institute for Laboratory Animal Research. Division on Earth and Life Studies. National Research Council of the National Academies. 2010.
55. Chandrani Gunaratna. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics in Drug Discovery: A Primer For Bioanalytical Chemists, Part II.* 2001.
56. Hartley, H.O. "The modified Gauss-Newton method for the fitting of nonlinear regression functions by least squares." *Technometrics.* 1961, 3(269-280).

57. Hyatt, J.M., McKinnon, P.S., Zimmer, G.S., Schentag, J.J. "The importance of pharmacokinetic/pharmacodynamic surrogate markers to outcome. Focus on antibacterial agents." *Clin Pharmacokinet.* 1995; 28(2): 143-60.
58. Jacobs, M.R. "Optimisation of antimicrobial therapy using pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters." *Clin Microbiol Infect.* 2001; 7(11): 589-96.
59. Jesaitis, A.J., Franklin, M.J., Berglund, D., Sasaki, M., Lord, C.I., Bleazard, J.B., Duffy, J.E., Beyenal, H., Lewandowski, Z. "Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: characterization of neutrophil and biofilm interactions." *J Immunol.* 2003; 171(8): 4329-39.
60. Knudsen, J. D., Frimodt-Moller, N., Espersen, F. "Experimental *Streptococcus pneumoniae* infection in mice for studying correlation of in vitro and in vivo activities of penicillin against pneumococci with various susceptibilities to penicillin." *Antimicrob Agents Chemother.* 1995, 39(6): 1253-8.
61. Kunin, C.M., Craig, W.A., Kornguth, M., Monson, R. "Influence of binding on the pharmacologic activity of antibiotics." *Ann N Y Acad Sci.* 1973, 226: 214-24.
62. Lacy, M.K., Lu, W., Xu, X., Tessier, P.R., Nicolau, D.P., Quintiliani, R., Nightingale, C.H. "Pharmacodynamic comparisons of levofloxacin,

ciprofloxacin, and ampicillin against *Streptococcus pneumoniae* in an in vitro model of infection." *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43(3): 672-7.

63. Lees, P. and Shojaee Aliabadi, F. "Rational dosing of antimicrobial drugs: animals versus humans." *Int J Antimicrob Agents*, 2002; 19(4): 269-84.

64. Leggett, J.E., Ebert, S., Fantin, B., Craig, W.A. "Comparative dose-effect relations at several dosing intervals for beta-lactam, aminoglycoside and quinolone antibiotics against gram-negative bacilli in murine thigh-infection and pneumonitis models." *Scand J Infect Dis.* 1990; Suppl 74: 179-84.

65. Leggett, J.E., Fantin, B., Ebert, S., Totsuka, K., Vogelman, B., Calame, W., Mattie, H., Craig, W. A. "Comparative antibiotic dose-effect relations at several dosing intervals in murine pneumonitis and thigh-infection models." *J Infect Dis.* 1989; 159(2): 281-92.

66. Leid, J.G., Shirliff, M.E., Costerton, J.W., Stoodley, P. "Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms." *Infect Immun.* 2002; 70(11): 6339-45.

67. Lewis, K. "Persister cells." *Annu Rev Microbiol.* 2010; 64: 357-72.

68. Lister, P.D. and Sanders, C.C., (a). "Pharmacodynamics of levofloxacin and ciprofloxacin against *Streptococcus pneumoniae*." *J Antimicrob Chemother.* 1999; 43(1): 79-86.

69. Lister, P.D. and Sanders, C.C., (b). "Pharmacodynamics of trovafloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin against *Streptococcus pneumoniae* in an in vitro pharmacokinetic model." *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43(5): 1118-23.
70. Lorian, V. "Medical relevance of low concentrations of antibiotics." *J Antimicrob Chemother.* 1993; 31 Suppl D: 137-48.
71. Lüchter, F. J. *Introducción al estudio de las enfermedades infecciosas.* 2003.
72. MacGowan, A. and Bowker, K. "Developments in PK/PD: optimising efficacy and prevention of resistance. A critical review of PK/PD in in vitro models." *Int J Antimicrob Agents.* 2002; 19(4): 291-8.
73. MacGowan, A., Rogers, C., Bowker, K. "The use of in vitro pharmacodynamic models of infection to optimize fluoroquinolone dosing regimens." *J Antimicrob Chemother.* 2000; 46(2): 163-70.
74. Madhu Sharma, A., Yadav. S. "Biofilms: Microbes and Disease." *Br.J. Infect.Dis.* 2008; 12(6):526-530.
75. Marchant, C.D., Carlin, S.A., Johnson, C.E.; Shurin, P.A. "Measuring the comparative efficacy of antibacterial agents for acute otitis media: the "Pollyanna phenomenon". *J Pediatr.* 1992; 120(1): 72-7.

76. Marchbanks, C.R., McKiel, J.R., Gilbert, D.H., Robillard, N.J., Painter, B., Zinner, S.H., Dudley, M.N. "Dose ranging and fractionation of intravenous ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in an in vitro model of infection." *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; 37(9): 1756-63.
77. Martinez, M., McDermott, P., Walker, R. "Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals." *Vet J.* 2006; 172(1): 10-28.
78. McKellar, Q.A.; SanchezBruni, S.F., Jones, D.G. "Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of antimicrobial drugs used in veterinary medicine." *J Vet Pharmacol Ther.* 2004, 27(6): 503-14.
79. Meneses, M.L y Landoni, M.F. "Biofilms Bacterianos." *Analecta Veterinaria.* 2012; 32 (1): 44-49.
80. Moffie, B.G., Hoogeterp, J.J., Lim, T., Douwes-Idema, A.E., Mattie, H. "Effectiveness of netilmicin and tobramycin against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in an experimental tissue infection in mice." *J Antimicrob Chemother.* 1993; 31(3): 403-11.
81. Monds, R.D. and O'Toole, G.A. "The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review." *Trends Microbiol.* 2009; 17(2): 73-87.

82. Mouton, J.W., Dudley, M.N., Cars, O., Derendorf, H., Drusano, G.L. "Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs." *Int J Antimicrob Agents*. 2002; 19(4): 355-8.
83. Moyed, H.S. and Bertrand, K.P. "hipA, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis." *J Bacteriol*. 1983; 155(2): 768-75.
84. NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, Pennsylvania, USA. Fourth edition: Approved Standard. 1997; Document M7-A4.
85. Nelson, E. "Kinetics of drug absorption, distribution, metabolism, and excretion." *J Pharm Sci*. 1961; 50: 181-92.
86. Neu, H.C. "General concepts on the chemotherapy of infectious diseases." *Med Clin North Am*. 1987; 71(6): 1051-64.
87. Nix, D.E., Goodwin, S.D., Peloquin, C.A., Rotella, D.L., Schentag, J. J., "Antibiotic tissue penetration and its relevance: impact of tissue penetration on infection response." *Antimicrob Agents Chemother*. 1991; 35(10): 1953-9.
88. Odenholt, I. "Pharmacodynamic effects of subinhibitory antibiotic concentrations." *Int J Antimicrob Agents*. 2001; 17(1): 1-8.

89. Oficina española de Patentes y Marcas. "Procedimiento para la obtención de formulaciones inyectables intramusculares de inhibidores de girasa." 1989; Número de publicación: ES 2 038 359 pp 18-21.
90. Papich, M.G., Davis, J.L., Floerchinger, A.M. "Pharmacokinetics, protein binding, and tissue distribution of orally administered cefpodoxime proxetil and cephalexin in dogs." *Am J Vet Res.* 2010; 71(12): 1484-91.
91. Park, H.R., Kim, T.H., Bark, K.M. "Physicochemical properties of quinolone antibiotics in various environments." *Eur J Med Chem* 2002; 37(6): 443-60.
92. Preston, S.L., Drusano, G.L. Berman, A. L., Fowler, C. L., Chow, A. T., Dornseif, B., Reichl, V., Natarajan, J., Corrado, M. "Pharmacodynamics of levofloxacin: a new paradigm for early clinical trials." *Jama.* 1998; 279(2): 125-9.
93. Ramon, J., Dautrey, S., Farinoti, R., Carbon, C., Rubinstein, E. "Intestinal elimination of ciprofloxacin in rabbits." *Antimicrob Agents Chemother.* 1994; 38(4): 757-60.
94. Rybak, M.J., Abate, B.J. Kang, S.L., Ruffing, M.J., Lerner, S.A., Drusano, G.L. "Prospective evaluation of the effect of an aminoglycoside dosing regimen on

- rates of observed nephrotoxicity and ototoxicity." *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43(7): 1549-55.
95. Rylander, M., Holm, S.E., Norrby, R., Brorson, J.E. "Studies on the pharmacokinetics of cefoxitin, cefuroxime, cephaloridine and cephalothin using subcutaneous tissue cages." *Scand J Infect Dis Suppl.* 1978;(13): 52-7.
96. Sanchez-Recio, M.M., Colino, C.I, Sanchez-Navarro, A. "A retrospective analysis of pharmacokinetic/pharmacodynamic indices as indicators of the clinical efficacy of ciprofloxacin." *J Antimicrob Chemother,* 2000; 45(3): 321-8.
97. Schaefer, H.G. and Michaelis, J. "Biopharmaceutical aspects of anti-infective therapy at the extremes of age." *J Antimicrob Chemother.* 1994; 34 Suppl A: 33-42.
98. Schentag, J.J. "Comparisons of pharmacokinetic parameters to efficacy of antibiotics: relationships between tissue concentrations, MIC values and bacterial eradication in patients with Gram-negative pneumonia". *Scandinavian journal of infectious diseases.* 1991; Suppl. 74: 218-234.
99. Schentag, J.J., Nix, D.E., Adelman, M.H. "Mathematical examination of dual individualization principles (I): Relationships between AUC above MIC and area under the inhibitory curve for cefmenoxime, ciprofloxacin, and tobramycin." *Dicp.* 1991; 25(10): 1050-7.

100. Schentag, J.J., Swanson, D.J., Smith, I.L. "Dual individualization: antibiotic dosage calculation from the integration of in-vitro pharmacodynamics and in-vivo pharmacokinetics." *J Antimicrob Chemother.* 1985; 15 Suppl A: 47-57.
101. Schwartz. "Estimating the dimension of a model". *Ann Stat.* 1978; 6: 461-464.
102. Shah, D., Zhang, Z., Khodursky, A., Kaldalu, N., Kurg, K., Lewis, K. "Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*." *BMC Microbiol.* 2006; 6: 53.
103. Shintani, S., Yamazaki, M., Nakamura M., Nakayama I. "A new method to determine the irritation of drugs after intramuscular injection in rabbits " *Toxicol. appl. Pharmacol.* 1967; 11(293-301).
104. Shojaee AliAbadi, F. and Lees, P. "Pharmacodynamic and pharmacokinetic inter-relationships of antibacterial drugs." *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1997; 20:14-17
105. Shojaee AliAbadi, F. and Lees, P. "Antibiotic treatment for animals: effect on bacterial population and dosage regimen optimisation." *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2000; 14:307-313.

106. Singhvi, S.M., Heald, A.F., Gadebusch, H.H., Resnick, M. E., Difazio, L.T., Leitz, M. A. "Human serum protein binding of cephalosporin antibiotics in vitro." J Lab Clin Med. 1977; 89(2): 414-20.
107. Spoering, A.L. and Lewis, K. "Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials." J Bacteriol. 2001; 183(23): 6746-51.
108. Steiness, E., Rasmussen, F., Svendsen, O., Nielsen, P. "A comparative study of serum creatine phosphokinase (CPK) activity in rabbits, pigs and humans after intramuscular injection of local damaging drugs." Acta Pharmacol Toxicol (Copenh). 1978; 42(5): 357-64.
109. Steppe, M., Aurora Prado, M.S., Tavares, M.F., Pinto, T.J., Kedor-Hackmann, E.R., Santoro, M.I. "Comparison of micellar electrokinetic chromatography, liquid chromatography, and microbiologic assay for analysis of cephalexin in oral suspensions." J AOAC. 2003; Int 86(4): 707-13.
110. SVARM. Swedish veterinary antimicrobial resistance monitoring, National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden (SVA). 2001; (Ed.) 2002

111. Tang, J.S. and Gillevet, P.M. "Reclassification of ATCC 9341 from *Micrococcus luteus* to *Kocuria rhizophila*." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2003; 53(Pt 4): 995-7.
112. The Laboratory Rabbit. Rabbit Users Wetlab. Administered by Laboratory Animals Centre. National University of Singapore. July, 2007ed.
113. Toothaker, R.D., Welling, P.G., Craig, W. A. "An in vitro model for the study of antibacterial dosage regimen design." *J Pharm Sci.* 1982;71(8):86-4.
114. Toutain, P.L. and Bousquet-Melou, A. "Free drug fraction vs free drug concentration: a matter of frequent confusion." *J Vet Pharmacol Ther.* 2002; 25(6): 460-3.
115. Toutain, P.L. and Bousquet-Melou A. (a). "Plasma terminal half-life." *J Vet Pharmacol Ther.* 2004; 27(6): 427-39.
116. Toutain, P.L. and Bousquet-Melou, A. (b). "Volumes of distribution." *J Vet Pharmacol Ther.* 2004; 27(6): 441-53.
117. Toutain, P.L., del Castillo, J.R., Bousquet-Melou, A. "The pharmacokinetic-pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics." *Res Vet Sci.* 2002; 73(2): 105-14.

118. Toutain, P.L., Ferran, A., Bousquet-Melou, A. "Species differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics." *Handb Exp Pharmacol* 2010; (199): 19-48.
119. Turnidge, J. "Pharmacodynamics and dosing of aminoglycosides." *Infect Dis Clin North Am.* 2003; 17(3): 503-28, v.
120. Udekwu, K.I., Parrish, N., Ankomah, P. Baquero, F. Levin, B.R. "Functional relationship between bacterial cell density and the efficacy of antibiotics." *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63(4): 745-57.
121. Varanda, F., Pratas de Melo, M., Cacüo A.I, Dohrn R., Foteini A.M., Tassios D., Voutsas, E., Marrucho I.M. "Solubility of Antibiotics in Different Solvents. 1. Hydrochloride Forms of Tetracycline, Moxifloxacin, and Ciprofloxacin." *Ind. Eng. Chem. Res.* 2006, 45, 6368-6374.
122. Vogelmann, B. and Craig W.A. "Kinetics of antimicrobial activity." *J Pediatr.* 1986; 108(5 Pt 2): 835-40.
123. Vogelmann, B., Gudmundsson, S., Leggett, J. Turnidge, J., Ebert, S. Craig, W.A. "Correlation of antimicrobial pharmacokinetic parameters with therapeutic efficacy in an animal model." *J Infect Dis.* 1988; 158(4): 831-47.
124. Vuong, C., Voyich, J.M., Fischer, E.R., Braughton, K.R., Whitney, A.R., DeLeo, F.R., Otto, M."Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects

Staphylococcus epidermidis against major components of the human innate immune system." *Cell Microbiol.* 2004; 6(3): 269-75.

125. Wagner, D.S., Salstrom, S.J., File, T.M., Tan, J. S. "Canine model for the simultaneous measurement of antibiotic levels in tissues and bacterial killing rate." *Antimicrob Agents Chemother.* 1986; 29(6): 965-8.
126. Walters, M.C, Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M.J., Stewart, P.S. "Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin." *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(1): 317-23.
127. Weber, A., Smith, A.L, Wong, K., Painter, B., Krol, G."Comparison of ciprofloxacin assays." *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 1988; 10(2): 123-7.
128. White, D.G., Acar, J., Anthony, F., Franklin, A., Gupta, R., Nicholls, T., Tamura, Y., Thompson, S., Threlfall, E.J., Vose, D., van Vuuren, M., Wegener, H.C., Costarrica, M.L., "Antimicrobial resistance: standardisation and harmonisation of laboratory methodologies for the detection and quantification of antimicrobial resistance." *Rev Sci Tech.* 2001; 20(3): 849-58.
129. Wolfson, J.S., Hooper, D.C., McHugh, G.L., Bozza, M.A., Swartz, M.N. and beta-lactam antimicrobial agents." *Antimicrob Agents Chemother.* 1990; 34(10): 1938-43.

130. Woodnutt, G. "Pharmacodynamics to combat resistance." *J Antimicrob Chemother.* 2000; 46 Suppl T1: 25-31.
131. Yamaoka, K., Nakagawa, T., Uno, T. "Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations." *J Pharmacokinet Biopharm* 1978; 6(2): 165-75.
132. Zak, O. and O'Reilly, T. "Animal models in the evaluation of antimicrobial agents." *Antimicrob Agents Chemother.* 1991; 35(8): 1527-31.
133. Zimmerli, W. "Experimental models in the investigation of device-related infections." *J Antimicrob Chemother.* 1993; 31 Suppl D: 97-102.
134. Zinner S, Gilbert. D., Simmons K, Lubenko I, Firsov A. "Strain independent anti pneumococcal effects of gemifloxacin in an in vitro dynamic model." *J Antimicrob Chemother.* 2001; 47(Supplement S1): p. 97, 41.
135. Zinner, S.H., Husson, M., Klastersky, J. "An artificial capillary in vitro kinetic model of antibiotic bactericidal activity." *Journal of infectious diseases* 1980; 144: 583-587.
136. Zuidema, J., Kadir, F., Titulaer, H.A.C., Oussoren, C. "Release and absorption rates of intramuscularly and subcutaneously injected

pharmaceuticals (II)." *International Journal of Pharmaceutics*. 1994; 105: 189-207.