



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

Estudio Farmacocinético de Formulaciones
Poliméricas de Liberación Controlada para
Marbofloxacino en Caprino

Dña. Rocío Fernández Palacios O'Connor

2013

DEDICATORIA

A mis padres Alejandro y Rocío, que han sabido guiarme en la difícil tarea de la vida. A pesar de la distancia, sois el empuje que me ha hecho llegar hasta donde estoy. Gracias a vosotros estoy en este lado del río y la vida es más fácil. Siempre hay un sitio al que volver.

A mi Caballero, que sabe como aguantarme y que comparte diariamente los buenos y malos momentos. Eres mi soporte, no cambies nunca.

A mi hermana que muestra su cariño y apoyo en la distancia.

A Manuel que a pesar de que ya no estás entre nosotros, te sigo teniendo de ejemplo. Gracias por tus historias y buenos momentos. Inculcaste unos valores que han llegado a tus descendientes.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna manera han contribuido a la realización de esta Tesis, y especialmente:

A los directores de esta tesis:

- Al Dr. Juan Manuel Serrano Rodríguez ya que sin su tesón, ayuda y guía este trabajo no habría sido posible. Muchas gracias por tu apoyo.
- Al Dr. Emilio Fernández Varón por brindarme esta gran oportunidad, por su ayuda, consejos, y por su extraordinaria guía y su confianza mostrada.

Al Dr. Carlos Cárcelos Rodríguez, quien siempre me ha mostrado su interés, su estímulo y ayuda.

A la Dra. Rosario Moyano por su apoyo, interés y ayuda a lo largo de todo este tiempo. Es un honor compartir el trabajo diario.

Al Dr. Juan Manuel Serrano Caballero porque la estadística es más sencilla con su ayuda.

A Verónica, técnico del Departamento de Farmacología, por su ayuda y predisposición a la hora de llevar a cabo las determinaciones analíticas necesarias para el desarrollo de este trabajo.

Al Director de la Granja del IMIDA de la facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, Juan Carrizosa Durán y a su equipo de trabajo por poner a nuestra disposición los animales empleados en el presente trabajo.

A todos los compañeros del SCAE, de la Universidad de Córdoba, con quienes comparto mi día a día y juntos pasamos también buenos momentos.

A la empresa Exopol (Exopol Laboratorios S.L.), y en especial a Rafael Baelga y Gema Chacón por la generosa cesión de las cepas de campo.

Este proyecto ha sido financiado con cargo a los proyectos AGL-2008-04/GAN del Ministerio de Ciencia e Innovación y 11850/PI/09 de la Fundación Séneca de la Región de Murcia.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	8
2.1.- Introducción histórica	9
2.2.- Estructura química y clasificación	10
2.3.- Relación estructura y actividad	19
2.4.- Propiedades físicas y químicas	22
2.5.- Mecanismo de acción	26
2.6.- Efecto postantibiótico de quinolonas	29
2.7.- Integración Farmacocinética-Farmacodinámica	31
2.7.1.- Antibacterianos tiempo dependiente y concentración dependiente	32
2.7.2.- Parámetros Farmacocinéticos-Farmacodinámicos. Extrapolación entre especies Animales	33
2.7.3. Limitaciones.	35
2.7.4. Ventana de selección de mutaciones y concentración preventiva de mutantes.	36
2.8. - Espectro antibacteriano.	36
2.9.- Resistencias	41
2.9.1.- Alteraciones que afectan a las dianas de las fluoroquinolonas	41
2.9.2.- Modificaciones que disminuyen la concentración de la Quinolona en el interior de la bacteria.	42
2.9.2.1. - Resistencias por alteración de la membrana externa en bacterias gram negativas	42
2.9.2.2.-Resistencia a causa de la sobreexpresión de bombas de eflujo en bacterias gram positivas y gram negativas.	42
2.9.3.- Sensibilidad a marbofloxacino. Puntos de Corte	47
2.10.- Propiedades farmacocinéticas	48
2.10.1.- Absorción y biodisponibilidad	48
2.10.2.- Distribución tisular y conjugación protéica.	50
2.10.3.- Aclaramiento plasmático y eliminación	52
2.10.4.- Diferencias entre especies de la fluorquinolonas	54
2.10.5.- Diferencias entre especies de marbofloxacino	56
2.10.6.- Penetración el Leche	57
2.11.- Interacciones	58
2.12.- Toxicidad y efectos adversos	60

3.7.2.- Análisis no compartimental. Plasma	89
3.7.3.- Análisis de datos. Leche	89
3.7.4.- Estimación de la absorción <i>in vivo</i> mediante deconvolución	89
3.8.- Métodos estadísticos	90
3.8.- Análisis microbiológicos: concentraciones mínimas inhibitorias y preventivas de mutantes (CMI y CPM). Ventana de selección de mutantes e índice de prevención de mutantes	91
3.8.1.- Concentraciones mínimas inhibitorias	91
3.8.2.- Concentraciones preventivas de mutantes. Ventana de selección de mutantes e índice de prevención de mutantes	92
4.- RESULTADOS	94
4.1.- Administración intravenosa de marbofloxacinó	95
4.2.- Administración subcutánea de marbofloxacinó	100
4.3.- Administración subcutánea de marbofloxacinó en solución del polímero P407 al 25%	104
4.4.- Administración subcutánea de marbofloxacinó en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2%	108
4.5.- Comparación de los parámetros farmacocinéticos de marbofloxacinó tras su administración intravenosa, subcutánea, subcutánea en solución del polímero P407 al 25% y subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2%	112
4.6.- Evaluación de la absorción <i>in vivo</i> mediante deconvolución	116
4.7.- Excreción a través de la leche de marbofloxacinó: administración intravenosa	128
4.8.- Excreción a través de la leche de marbofloxacinó: administración subcutánea	135
4.9.- Excreción a través de la leche de marbofloxacinó: administración subcutánea en solución del polímero P407 al 25%	141
4.10.- Excreción a través de la leche de marbofloxacinó: administración subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2%	147
4.11.- Comparación de los parámetros farmacocinéticos de marbofloxacinó en la leche tras su administración vía intravenosa, subcutánea, subcutánea en solución del polímero P407 al 25% y subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2%	153
4.12.- Parámetros farmacocinéticos farmacodinámicos obtenidos frente a cepas de <i>Staphylococcus Aureus</i>	157
5.- DISCUSIÓN	162
5.1.- Introducción	162

5.2.- Administración intravenosa de marbofloxacino en cabras	163
5.2.1.- Modelo farmacocinético	163
5.2.2.- Parámetros farmacocinéticos	165
5.2.2.1.- Constantes híbridas de disposición rápida y lenta	165
5.2.2.2.- Microconstantes	166
5.2.2.3.- Tiempo de Semivida	169
5.2.2.4.- Área Bajo la Curva	169
5.2.2.5.- Tiempo Medio de Residencia	170
5.2.2.6.- Aclaramiento plasmático	171
5.2.2.7.- Volúmenes de distribución aparente	172
5.3.- Administración subcutánea de enrofloxacino en cabras	174
5.3.1.- Modelo farmacocinético	174
5.3.2.- Parámetros farmacocinéticos	176
5.3.2.1.- Tiempo de semivida	176
5.3.2.2.- Tiempo máximo y concentración máxima	177
5.3.2.3.- Constante de absorción y semivida de absorción	178
5.3.2.4.- Área bajo la curva y biodisponibilidad	179
5.3.2.5.- Tiempo Medio de Residencia y Tiempo medio de Residencia de Absorción	180
5.4.- Administración subcutánea de marbofloxacino en solución del polímero P407 al 25% en cabras	181
5.4.1.- Modelo farmacocinético	181
5.4.2.- Parámetros farmacocinéticos	182
5.4.2.1.- Tiempo de semivida	183
5.4.2.2.- Tiempo máximo y concentración máxima	183
5.4.2.3.- Constante de absorción y semivida de absorción	184
5.4.2.4.- Área bajo la curva y biodisponibilidad	185
5.4.2.5.- Tiempo Medio de Residencia y Tiempo medio de Residencia de Absorción	186
5.5.- Administración subcutánea de enrofloxacino en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% en cabras	186
5.5.1.- Modelo farmacocinético	186
5.5.2.- Parámetros farmacocinéticos	188
5.5.2.1.- Tiempo de semivida	188
5.5.2.2.- Tiempo máximo y concentración máxima	189

5.5.2.3.- Constante de absorción y semivida de absorción	189
5.5.2.4.- Área bajo la curva y biodisponibilidad	190
5.4.2.5.- Tiempo Medio de Residencia y Tiempo medio de Residencia de Absorción	193
5.6.- Comparación entre administraciones	191
5.6.1.- Semivida en la fase terminal ($t_{1/2\lambda,z}$)	192
5.6.2.- Tiempo medio de residencia (MRT)	193
5.6.3.- Constante de absorción (k_a)	194
5.6.4.- Tiempo máximo ($T_{m\acute{a}x}$) y concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$)	195
5.6.5.- Tiempo medio de absorción (MAT)	197
5.6.6.- Área bajo la curva (AUC)	198
5.6.7.- Biodisponibilidad (F)	199
5.7.- Estudio farmacocinético de la absorción extravascular de marbofloxacino mediante deconvolución	201
5.8.- Estudio farmacocinético de la excreción en leche de marbofloxacino.	204
5.8.1.- Evolución de las concentraciones de marbofloxacino en leche: administración intravenosa.	204
5.8.1.1.- Tiempo máximo ($T_{m\acute{a}x}$) y concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$)	205
5.8.1.2.- Área bajo la curva (AUC) y ratio AUC_{leche}/AUC_{plasma}	205
5.8.1.3.- Tiempo medio de residencia (MRT)	206
5.8.1.4.- Cantidad total de marbofloxacino eliminada en leche	206
5.8.2.- Evolución de las concentraciones de marbofloxacino en leche: administración subcutánea	207
5.8.2.1.- Tiempo máximo ($T_{m\acute{a}x}$) y concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$)	207
5.8.2.2.- Área bajo la curva (AUC) y ratio AUC_{leche}/AUC_{plasma}	208
5.8.2.3.- Ratio $C_{m\acute{a}x-leche}/C_{m\acute{a}x-plasma}$	209
5.8.2.4.- Tiempo medio de residencia (MRT)	209
5.8.2.5.- Cantidad total de marbofloxacino eliminada en leche	209
5.8.3.- Evolución de las concentraciones de marbofloxacino en leche: administración subcutánea en solución del polímero P407 al 25%	210
5.8.3.1.- Tiempo máximo ($T_{m\acute{a}x}$) y concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$)	210
5.8.3.2.- Área bajo la curva (AUC) y ratio AUC_{leche}/AUC_{plasma}	211
5.8.3.3.- Ratio $C_{m\acute{a}x-leche}/C_{m\acute{a}x-plasma}$	212
5.8.3.4.- Tiempo medio de residencia (MRT)	213
5.8.3.5.- Cantidad total de marbofloxacino eliminada en leche	213
5.8.4.- Evolución de las concentraciones de marbofloxacino en leche:	

administración subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2%	213
5.8.4.1.- Tiempo máximo ($T_{m\acute{a}x}$) y concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$)	214
5.8.4.2.- Área bajo la curva (AUC) y ratio AUC_{leche}/AUC_{plasma}	214
5.8.4.3.- Ratio $C_{m\acute{a}x-leche}/C_{m\acute{a}x-plasma}$	215
5.8.4.4.- Tiempo medio de residencia (MRT)	215
5.8.4.5.- Cantidad total de marbofloxacino eliminada en leche	215
5.9.- Comparación entre administración intravenosa, subcutánea y subcutánea de marbofloxacino en: solución del polímero P407 al 25% y en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2%.	216
5.9.1.- Área bajo la curva (AUC)	216
5.9.2.- Tiempo medio de residencia (MRT)	217
5.9.3.- Tiempo máximo ($T_{m\acute{a}x}$) y concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$)	218
5.9.4.- Ratio $C_{m\acute{a}x-leche}/C_{m\acute{a}x-plasma}$	220
5.10.- Integración farmacocinética/farmacodinámica	221
6.- CONCLUSIONES	230
7.- RESUMEN	237
8.- SUMMARY	240
9.- BIBLIOGRAFÍA	241
10.- ABREVIATURAS	271

1.-INTRODUCCIÓN.

El objetivo de la farmacocinética consiste en estudiar la evolución temporal de las concentraciones y cantidades de fármaco y sus metabolitos en fluidos orgánicos, tejidos y excrementos, así como su respuesta farmacológica, y construir modelos adecuados para interpretar los datos obtenidos. Los datos se procesan empleando modelos matemáticos a los que se ajustan las concentraciones, las cantidades de fármaco o sus metabolitos en la totalidad del organismo, o en alguna de sus partes. Las ecuaciones así obtenidas sirven para formular predicciones acerca de los resultados que se obtendrían con tratamientos medicamentosos, ya que la respuesta farmacológica viene determinada por la cantidad de fármaco que accede a los lugares de acción, y este acceso está condicionado por la concentración sanguínea del fármaco. En las especies animales de producción de alimentos, los antimicrobianos y antiparasitarios son, sin duda, fármacos utilizados con mucha frecuencia, casi sistemáticamente. De ello se derivan una serie de circunstancias, entre las que destacan:

- El coste total del tratamiento, que supone un incremento en los gastos de producción. En este sentido, debido a que el rendimiento neto es menor, hemos de procurar que estos gastos sean mínimos, sin que por ello disminuya la eficacia del tratamiento.
- El mantenimiento de unos niveles eficaces de fármaco es fundamental en cualquier tipo de tratamiento, pero con los antibacterianos es, además, imprescindible, ya que de no observarse esta condición, se pueden producir resistencias bacterianas, con los inconvenientes que ello conlleva, junto con la menor o nula eficacia del tratamiento y el innecesario incremento de los costes de producción.
- Otro de los aspectos de mayor relevancia, es evitar la presencia de residuos en los productos alimenticios de origen animal destinados al consumo humano.

Las fluoroquinolonas son un grupo de antibacterianos sintéticos que despiertan alto interés tanto en medicina humana, como en medicina veterinaria (Ihrke y cols., 1999). Comparados con otros agentes antimicrobianos, las fluoroquinolonas presentan, además de un amplio espectro, una buena absorción tras la administración vía oral, un alto volumen de distribución, penetrando en casi todos los tejidos y células del organismo y un tiempo de semivida prolongado, permitiendo regímenes posológicos con 1-2 administraciones al día (Walker, 2000; Schentag, 2000).²

A las dosis apropiadas, las fluoroquinolonas son bactericidas, presentando un patrón concentración dependiente y un prolongado efecto postantibiótico (Walker, 2000). El

conocimiento y monitorización de estos antimicrobianos, especialmente sus características farmacocinéticas y farmacodinámicas frente a patógenos determinados, permite optimizar el régimen de dosificación, para evitar la aparición de mutantes resistentes y conseguir el éxito clínico (Aminimanizani y cols., 2001).

En los últimos diez años se han introducido nuevas fluoroquinolonas en el campo de la terapéutica. Estos nuevos agentes muestran una actividad aumentada frente a gram positivos y anaerobios y retienen la actividad propia de las quinolonas precedentes frente a gram negativos (Aminimanizani y cols., 2001).

El marbofloxacino es una fluoroquinolona desarrollada exclusivamente para uso veterinario cuya molécula es 9-fluoro- 2,3-dihidro- 3 metil- 10 (4-metil-1-piperacini)- 7-oxo- 7H pirido (3,2,1-ij) (4,1,2) benzoxadiacina- 6 ácido carboxílico. Presenta un anillo de oxadiadiazina, que se supone que confiere a la molécula ventajas farmacocinéticas como mayor tiempo de semivida y mayor volumen de distribución (Marín y cols, 2009). En la práctica, estas características pueden permitir la administración cada 24 horas manteniendo concentraciones por encima de la CMI durante más de 12 horas (Milanova Haritova y cols., 2006). Además, marbofloxacino es eficaz frente a un amplio abanico de bacterias gram-positivas (especialmente *Staphylococcus spp.* y *Streptococcus spp.*) y gram-negativas (especialmente *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, *Proteus sp*, *Klebsiella sp*, *Pasteurella sp*, *Moraxella sp* y *Pseudomonas sp*) (Spreng y cols., 1995).

La farmacocinética de marbofloxacino se ha estudiado en distintas especies animales, entre ellas caballo (Bousquet-Melou y cols., 2002 a-b; Carretero y cols., 2002; Voermans y cols., 2006; Gardner y cols., 2004), búfalo (Goudah y cols., 2007), cerdo (Ding y cols., 2010), vaca (Schneider y cols, 2004), cabra (Waxman y cols., 2001, 2004, 2006 y 2007; Sidhu y cols., 2006 y 2010), guacamayo (Carpenter y cols, 2006), pavo (Haritova y cols., 2006), burro (González y cols, 2007), pitón (Coke y cols., 2006), ternero (Sidhu y cols., 2005; Ismail y El-Kattan, 2006), buitre (García-Montijano y cols., 2001-2010), avestruz (de Lucas y cols., 2007), foca común (KuKanich y cols., 2007) y tortuga (Lai y cols., 2009; Marin y cols., 2009).

En lo que a animales de producción se refiere, cuando se administran fármacos a una gran rebaño, la velocidad de administración, la mínima manipulación y el daño limitado, son consideraciones importantes. Los métodos preferidos son la inyección SC, la dosis oral o la incorporación en pienso y agua, también suelen utilizarse infusiones intramamarias. Por otro

lado, la liberación controlada de fármacos administrados por vía parenteral ha adquirido una importancia creciente en el desarrollo de nuevas formulaciones farmacéuticas. Esto se manifiesta de forma especial en la industria farmacéutica orientada a la Sanidad Animal, implicada en la generación de formulaciones de liberación controlada para algunos fármacos, tanto para animales de compañía como de producción (Matschke y cols., 2002). Resulta interesante poder administrar el medicamento con amplios intervalos, lo que supone un menor coste y un menor estrés de manejo de los animales (Sun y cols., 2002). La ventaja potencial de una absorción controlada es que se mejora la eficiencia del tratamiento, al reducir la fluctuación de las concentraciones estacionarias y al aumentar la biodisponibilidad (Longer y Robinson, 1987) así como disminuir el número de administraciones.

Se han estudiado formulaciones de liberación controlada en varias quinolonas, como levofloxacino (Yin y cols., 2011), ciprofloxacino (Fulzele y cols., 2007; Waknis y Jonnalagadda, 2011), moxifloxacino (Cárceles y cols., 2006), difloxacino (Marín y cols., 2010a; Escudero y cols., 2011), ofloxacino (Bahk y cols., 2000), enrofloxacino (Cabanés y cols., 1995; Xie y cols., 2011) y fleroxacino (Dounis y cols., 1996). Por vía oftálmica, levofloxacino (Gupta y cols., 2010a), ciprofloxacino (Jain y cols., 2010), ofloxacino (Abraham y cols., 2009), gatifloxacino (Ibrahim y cols., 2010), sparfloxacino (Gupta y cols., 2010b; Nesseem y cols., 2011) y pefloxacino (Sultana y cols., 2006).

Cuando el fármaco se administra por vía parenteral, la absorción puede modificarse mediante la formación de complejos disociables con macromoléculas, un proceso semejante a la unión a proteínas plasmáticas. El complejo fármaco-macromolécula puede servir de reservorio en el sitio de inyección, dando lugar a una liberación controlada. Como macromoléculas se utilizan polímeros sintéticos como polivinilpirrolidona (PVP), polietilenglicol o metilcelulosa (Sun y cols., 2002). También puede retardarse la absorción mediante la modificación de la viscosidad del medicamento. Así, el P407 (70% polioxietileno + 30% polioxipropileno) es un polímero que presenta una baja toxicidad, buena compatibilidad con muchos fármacos y alta capacidad de solubilización, además ha sido aprobado su uso por la Food and Drug Administration (FDA) en Estados Unidos. Este producto en solución acuosa entre 20-30% presenta la ventaja de su gelificación termo-reversible desde su forma de baja viscosidad a 4°C hasta forma de semi-gel a la temperatura corporal (37°C). Esta propiedad hace de él un excelente vehículo para la liberación controlada (Narasimhan y Pepas, 1997). La propiedad de ser poco viscoso a

temperaturas inferiores a la corporal hace que se evite la aparición de dolor en el punto de inyección. Además, mediante la adición de diferentes coadyuvantes que modifiquen su viscosidad podremos obtener diferentes grados de liberación de los fármacos. Diversas sustancias pueden ser adicionadas al P407 con este fin. Entre ellas se pueden mencionar la polivinilpirrolidona (PVP), la hidroxipropil-metilcelulosa y la carboximetilcelulosa, siendo esta última bien tolerada (Zhang y cols., 2002).

La importancia del ganado caprino es cada vez mayor debido a diversas causas (Vacas, 2003). Por un lado las razas lecheras dan producciones importantes sin estar sujetas a restricciones por parte de la UE (cuotas lecheras). Esto hace que incluso ganaderos de bovino, estén introduciendo en sus granjas este ganado. Por otro, su carne no despierta el recelo que despierta la del bovino a causa de la encefalitis esponjiforme. Y, por último, el caprino, por su rusticidad hace que puedan aclimatarse y ser explotadas zonas semiáridas o áridas.

Estos animales sufren diversas patologías infecciosas, entre las que se incluyen la agalaxia contagiosa. Esta enfermedad es la más importante desde el punto de vista económico en el caprino y ovino lechero de la cuenca mediterránea. Supone además, el principal problema en los planes de control de mamitis y está causada principalmente por *Mycoplasma agalactiae*, aunque pueden intervenir otros micoplasmas, como *Mycoplasma mycoides*, *Mycoplasma capricolum*, y otros gérmenes como *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermitis* (Corrales y cols., 1997).

Considerando todo lo expuesto hasta el momento, y dada la importancia de la cabra en la producción animal, nos hemos planteado en la siguiente memoria estudiar la farmacocinética de marbofloxacino en esta especie con el fin de alcanzar los siguientes objetivos:

1. Determinación de los parámetros farmacocinéticos de marbofloxacino tras la administración intravenosa y subcutánea, en solución acuosa.
2. Determinación de los parámetros farmacocinéticos marbofloxacino tras su administración subcutánea, en solución del polímero P407 al 25% y en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2%.

3. La determinación, y cuantificación, de la eliminación de marbofloxacino en la leche, dependiendo de la vía de administración y la formulación empleada, así como sus perfiles cinéticos correspondientes.
4. Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de marbofloxacino frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, aisladas de cabras procedentes de granjas comerciales, como germen representativo de procesos infecciosos mamarios en la especie a estudiar.
5. Establecimiento de los parámetros farmacocinéticos-farmacodinámicos de marbofloxacino utilizando las CMI calculadas en el objetivo anterior, para la proposición de un régimen posológico que optimice la eficacia de este antibiótico frente a *Staphylococcus aureus*, minimizando el riesgo de aparición de resistencias.

2- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1.- INTRODUCCIÓN HISTÓRICA

Las 4-quinolonas, también denominadas análogos o derivados del ácido nalidíxico, o simplemente quinolonas, deben su nombre al oxígeno exocíclico en posición 4 (Appelbaum y Hunter, 2000) y a la palabra “quinolona”, la cual es una transformación del término 4-oxo-1,4-dihidroquinoleína, estructura común de los derivados de la quinoleína. Estos antimicrobianos constituyen un grupo heterogéneo de quimioterápicos de síntesis y se usan desde hace más de 40 años (Dámaso, 1990).

Históricamente, Price obtuvo en 1949, por degradación de alcaloides, el ácido 1-metil-4-quinolon-3-carboxílico, una molécula sin actividad biológica, a la que denominó quinolona. Más tarde se fueron sintetizando compuestos similares, algunos con poder antibacteriano, pero sin aplicación clínica (Gobernado y Santos, 2002). El primer compuesto introducido en terapéutica en el año 1962, por Leshner y cols., fue el ácido nalidíxico, derivado de síntesis del grupo de las 1,8-naftiridinas y descubierto al azar en plena síntesis del antipalúdico cloroquina. El ácido nalidíxico fue la primera quinolona útil para el tratamiento de infecciones localizadas en las vías urinarias. En 1968, Turner y cols., sintetizan el ácido oxolínico. Más tarde, en 1971, Shimizu y cols. comunican la síntesis del ácido piromídico y en 1973, Wick y cols., publican la obtención de cinoxacino. La introducción de una cadena lateral piperazinil en posición 7, a partir de la cual surgió el ácido piperámico o pipemídico, sintetizado por Shimizu y cols., en 1975, mejoró su actividad frente a gram negativos, ampliando el espectro incluso frente a *Pseudomonas* spp (Dámaso, 1990; Shimizu, 1975). Los quimioterápicos, ácido nalidíxico, enoxacino, ácido oxolínico, ácido piromídico, ácido piperámico o pipemídico y cinoxacino se emplearon como antisépticos urinarios (preferentemente), intestinales y biliares, en virtud de su actividad primariamente bacteriostática y de su espectro fundamentalmente restringido a bacilos gram negativos (Dámaso, 1990).

Varios aspectos han limitado la utilización sistémica del ácido nalidíxico (Abelson y Hallas, 2003; Appelbaum y Hunter, 2000; Gobernado y Santos, 2002; Stockley, 2004):

- Pobre absorción tras la administración por vía oral.
- Limitado espectro antimicrobiano (modesta actividad frente a Gram negativos), que provocó un uso restringido al tratamiento de las infecciones del tracto urinario, en el cual se encontraban altas concentraciones de fármaco.
- Corta semivida y alta unión a proteínas.

En el desarrollo de nuevas quinolonas, el primer paso adelante se produjo al incorporar uno, dos y hasta tres átomos de flúor en la molécula 7-piperazino-4-quinolona dando lugar a las denominadas quinolonas fluoradas o fluoroquinolonas, que poseen un espectro más amplio y una mayor actividad antibacteriana que los compuestos precedentes (ácidos nalidíxico, oxolínico, piromídico, pipemídico, cinoxacino y acroxacino). Existe un antecedente -la flumequina-, sintetizada en 1973, quinolona que contiene un átomo de flúor en su estructura, pero que no goza de las características farmacocinéticas de las nuevas fluoroquinolonas. El desarrollo de la primera fluoroquinolona, el norfloxacin, con átomos sustituyentes 6-fluorina y 7-piperacina, demostró una mejorada actividad antibacteriana frente a gram negativos y gram positivos, incluso frente a *Pseudomonas aeruginosa* y estafilococos respectivamente (Abelson y Hallas, 2003; Andriole, 1989; Dámaso, 1990).

Aunque desde el ácido nalidíxico hasta el norfloxacin pasaron cerca de dos décadas, la siguiente fase de investigación se desarrolló muy rápidamente. Norfloxacin fue patentado en 1978, y tres años más tarde se patentaron muchas más fluoroquinolonas nuevas, de las cuales, algunas fueron rechazadas en el mercado, aunque otras todavía hoy se comercializan: pefloxacin (patentada en 1979), enoxacin (1980), fleroxacin (1981), ciprofloxacino (1981) y ofloxacino (1982). Las ventajas de estos compuestos residen en un espectro que incluye tanto especies bacterianas pertenecientes a gram positivos, como a gram negativos, y en una buena absorción vía oral, proporcionando niveles adecuados en plasma. A partir de estas moléculas, las quinolonas pasaron a ser utilizadas en infecciones sistémicas. Si bien, y pese a las mejoras introducidas, algunas especies, concretamente *Staphylococcus aureus* y *P. aeruginosa*, mostraron resistencia a este grupo de quimioterápicos (Appelbaum y Hunter, 2000; Emmerson y Jones, 2003).

Durante la última década, la investigación con fluoroquinolonas, concretamente en el ámbito de sus propiedades microbiológicas ha tenido como objetivos (Appelbaum y Hunter, 2000):

1. Mejorar su actividad frente al neumococo, incluyendo aquellas cepas resistentes a betalactámicos o a otros antibióticos como los macrólidos.
2. Mejorar la actividad frente a estafilococos, concretamente *S. aureus* meticilin resistentes.
3. Mejorar la actividad, en general, contra cocos gram positivos.

4. Mejorar la actividad frente a anaerobios.
5. Mejorar la actividad frente a cepas resistentes a ciprofloxacino y ofloxacino, incluyendo cepas de estafilococos y enterobacterias.
6. Mantener buena actividad frente a gram negativos, incluyendo *Pseudomonas spp.* y distintas especies no fermentadoras.
7. Disminuir la velocidad de aparición de resistencias.

Por tanto, los siguientes compuestos comercializados fueron dirigidos hacia la consecución de estos objetivos. Así, en este grupo se encuentran esparfloxacino, levofloxacino y grepafloxacino, que mejoraron el perfil farmacocinético y la actividad frente a anaerobios y gram positivos (particularmente el neumococo), pero aunque poseen mayor actividad frente a estafilococos que ciprofloxacino y ofloxacino, ésta aún no resulta la ideal (Appelbaum y Hunter, 2000; Lubasch y cols., 2000).

El grupo de compuestos que muestra de forma más drástica mejoras a este respecto está compuesto por clinafloxacino, gatifloxacino, gemifloxacino, moxifloxacino, sitafloxacino y trovafloxacino. Estos fármacos comparten con ciprofloxacino su actividad frente a gram negativos y muestran buena actividad frente a la mayoría de gram positivos (Appelbaum y Hunter, 2000). Pero en su desarrollo no todo han sido avances, en 1999, trovafloxacino fue retirado del mercado mundial debido a la descripción de varios casos de hepatotoxicidad fulminante, y grepafloxacino se retiró por cardiotoxicidad (Emmerson y Jones, 2003). Enoxacino, pefloxacino y fleroxacino presentan fototoxicidad, temafloxacino se asoció a severos síndromes urémicos-hemolíticos y lomefloxacino causa fototoxicidad y efectos sobre SNC, y por ello fue retirado del mercado. Esparfloxacino se asoció a fototoxicidad y prolongación del intervalo QTc. Tosufloxacino causa severa trombocitopenia y nefritis y por último clinafloxacino se asoció a fototoxicidad e hipoglucemia (Rubinstein, 2001; Fish, 2001; Mandell y cols., 2001).

En definitiva, se han desarrollado un gran número de quinolonas, muchas simplemente patentadas, otras en fase avanzada de desarrollo, algunas comercializadas, y otras abandonadas al poco de su comercialización por provocar graves efectos adversos.

En el ámbito veterinario, este grupo de antimicrobianos ha sufrido un gran desarrollo y expansión, apareciendo diferentes fluoroquinolonas registradas exclusivamente para Medicina Veterinaria. Así encontramos: marbofloxacino, orbifloxacino, enrofloxacino, pradofloxacino,

difloxacino e ibafloxacino (AEMPS, 2012; EMA, 2012). Las fluoroquinolonas se utilizan ampliamente para un importante número de infecciones en caninos, felinos, equinos, bovinos, ovinos, caprinos, porcinos y aves, debido a su alta potencia, amplio espectro, actividad bactericida dependiente de la concentración, óptimas características farmacocinéticas y baja toxicidad. Son eficaces para el tratamiento de neumonías en lechones y terneros, otitis en caninos, infecciones urinarias en animales de compañía, infecciones dérmicas en caninos y felinos e infecciones gastrointestinales en porcinos, bovinos y aves (Ihrke y cols., 1999; Lees y cols., 2002b).

2.2 ESTRUCTURA QUÍMICA Y CLASIFICACIÓN

Las 4-quinolonas son ácidos orgánicos con un pK_a elevado y, en general, comparten un núcleo común: la estructura bicíclica 4-oxo-1,4-dihidroquinoleína, o 4-quinolona, compuesta de dos anillos, uno de tipo piridona, con un ácido carboxílico libre en posición 3 y un átomo de nitrógeno en posición 1, y un segundo anillo aromático (Gobernado y Santos, 2002).

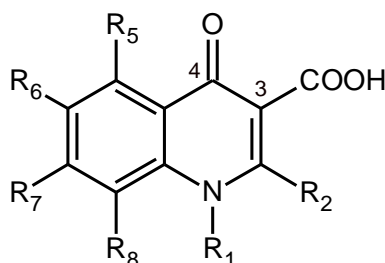


Figura 1.- Estructura básica o núcleo de las quinolonas.

Desde un punto de vista químico, las quinolonas pueden clasificarse en cuatro grupos: sustancias sintéticas de estructura naftiridínica (ej: ácido nalidíxico y enoxacino), quinolónica (ej: ácido oxolínico), pirimidínica (ej: ácido piromídico, ácido piperámico o pipemídico) o cinolónica (cinoxacino) (Dámaso, 1990).

De esta forma, se puede establecer una clasificación de las quinolonas en base a las diferentes estructuras químicas y a la aparición de estos quimioterápicos en el mercado (Gobernado y Santos, 2002):

I.- PRIMERA GENERACIÓN:

1.- Derivados de la naftiridina:

1.1.- No fluoradas: Ácido nalidíxico.

1.2.- Fluoradas: Enoxacino, Tosufloxacino.

2.- Derivados de la cinolina: Cinoxacino

3.- Derivados de la piridopirimidina:

Ácido piromídico,

Ácido pipemídico o piperámico.

4.- Derivados de la quinoleína:

4.1.- Quinolonas no fluoradas:

Ácido oxolínico.

Acroxoxacino (antes rosoxacino).

Droxacino.

Miloxacino.

4.2.- Monofluoroquinolonas: Flumequina.

II.- SEGUNDA GENERACIÓN (derivados de la quinoleína)

1.- Monofluoroquinolonas:

Amifloxacino.

Ciprofloxacino.

Irloxacino o pifloxacino.

Levofloxacino

Norfloxacino.

Ofloxacino.

Pefloxacino.

2.- Difluoroquinolonas: Difloxacino, Lomefloxacino.

3.- Trifluoroquinolonas: Fleroxacino, Temafloxacino.

III.- TERCERA GENERACIÓN

1.- Monofluoroquinolonas (derivados de la quinoleína):

Grepafloxacinó,

Gatifloxacinó.

2.- Difluoroquinolonas (derivados de la quinoleína): Esparfloxacinó.

3.- Trifluoroquinolonas (derivados de la naftiridina): Tosufloxacinó.

IV.- CUARTA GENERACIÓN (derivados de la quinoleína)

1.- Monofluoroquinolonas: Clinafloxacinó, Moxifloxacinó.

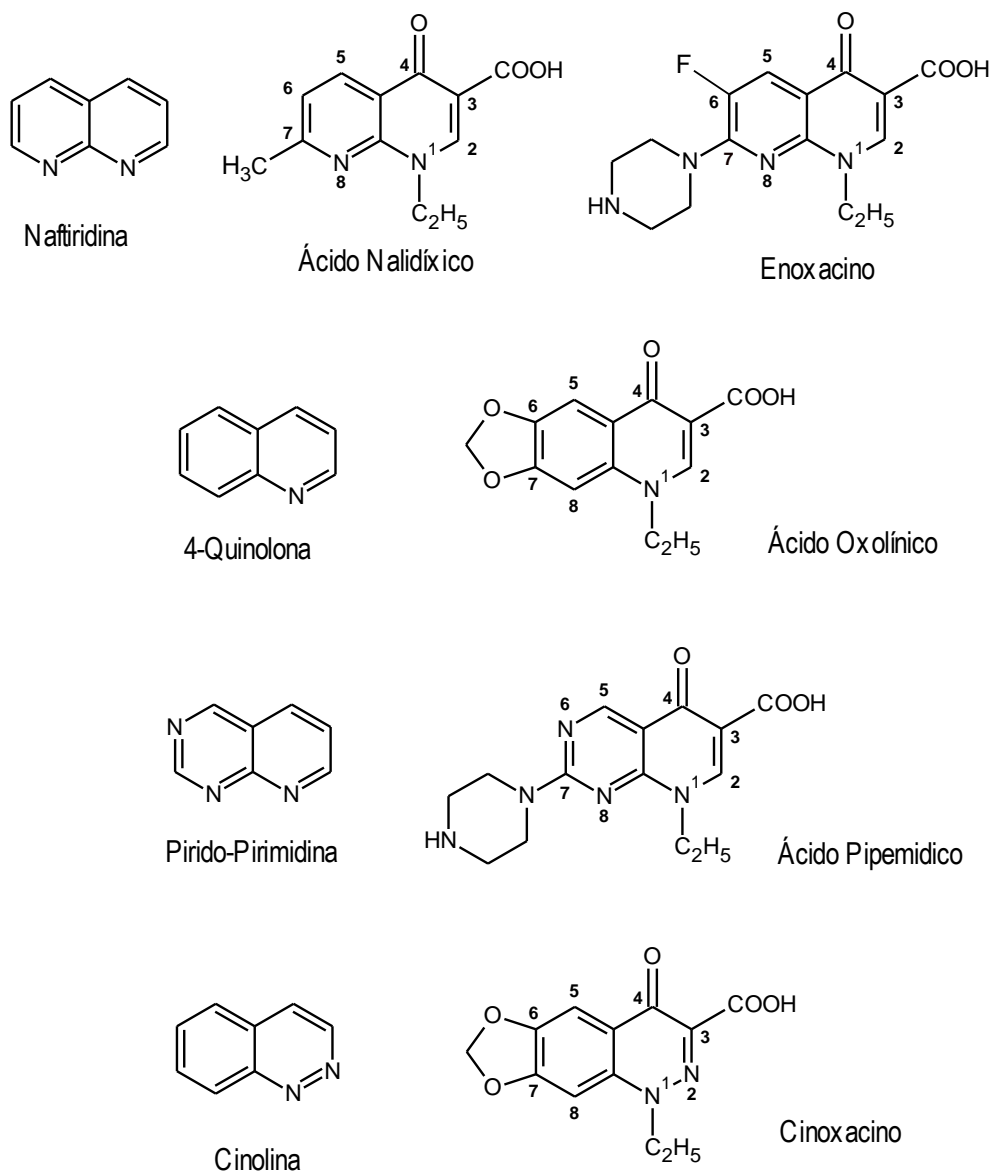


Figura 2.- Estructuras básicas de las quinolonas.

Cada grupo o generación de quinolonas presenta una serie de características:

Primera generación (Figura 3): moléculas históricamente más antiguas y que definen los núcleos básicos de estos antimicrobianos. Estructuralmente se caracterizan, en su mayoría, por la ausencia de un sustituyente 6-fluoro, con excepción de flumequina o enoxacino, y por no exhibir una asociación de 6-fluoro con el grupo piperazina en posición C7 (presente en el ácido pipemídico y en enoxacino).

Se caracterizan además, por su reducido espectro de actividad y por ser agentes quimioterápicos sólo útiles en infecciones del tracto urinario (Gootz y Brighty, 1998; Andriole, 1998). Útiles frente a ciertas especies de Enterobacterias, y no frente a otras especies como *Pseudomonas*, cocos Gram positivos y anaerobios (King y cols., 2000).

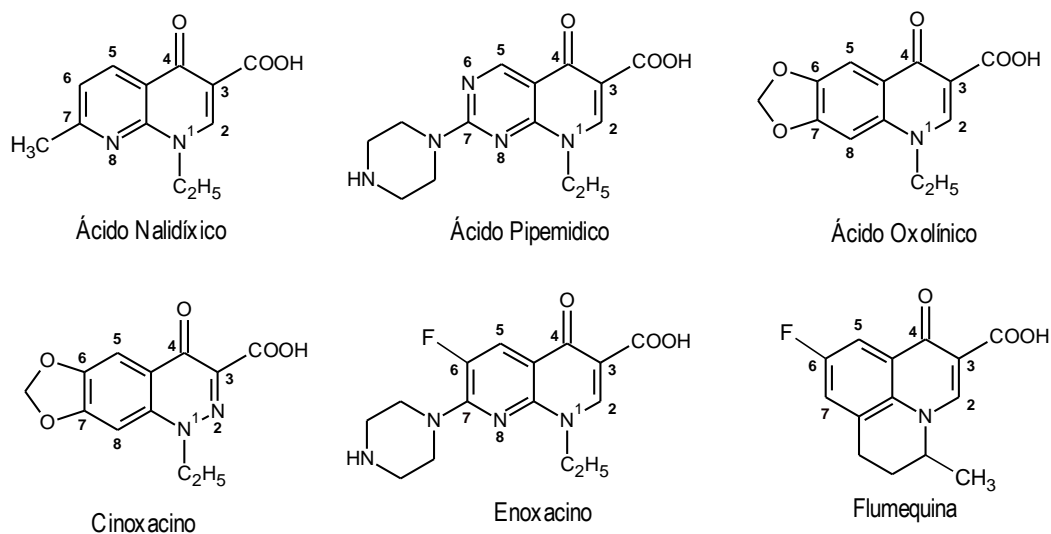


Figura 3.- Principales quinolonas de primera generación.

Segunda generación (Figura 4): presentan de manera constante un átomo de flúor en la posición 6, el cuál permite aumentar tanto la afinidad por sus blancos (topoisomerasas tipo II) como la capacidad de penetración al interior de la célula bacteriana (hasta setenta veces con respecto a las quinolonas que no tienen flúor en esta posición (Sumano, 1993) y una piperazina o metilpiperazina (diamina cíclica) en la posición 7 del núcleo quinolónico (Tálens-Visconti y

cols., 2002). La molécula estándar de esta generación es norfloxacino. A todas ellas se las conoce normalmente como *fluoroquinolonas*. Clínicamente presentan mayor potencia, amplio espectro antimicrobiano, buenas propiedades farmacocinéticas, menor toxicidad, menos efectos secundarios y menores resistencias bacterianas. Presentan actividad frente *Pseudomonas aeruginosa*, algunas bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y determinadas especies de micobacterias, clamidias y rickettsias. Su actividad frente a *Acinetobacter* y *Stenotrophomonas maltophilia* es moderada y escasa frente a *Streptococcus pneumoniae* y otras especies de *Streptococcus* (King y cols., 2002, Gootz y Brighty, 1998; Furet y Pechere, 1991). Sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SAMR) rápidamente se estableció resistencia (Schaefer, 1989).

Son moléculas utilizadas para una serie de infecciones graves que incluyen cuadros osteoarticulares, digestivos, de tejidos blandos, infecciones respiratorias e infecciones de transmisión sexual (Von Rosenstiel y Adam, 1994; Fink y cols., 1994).

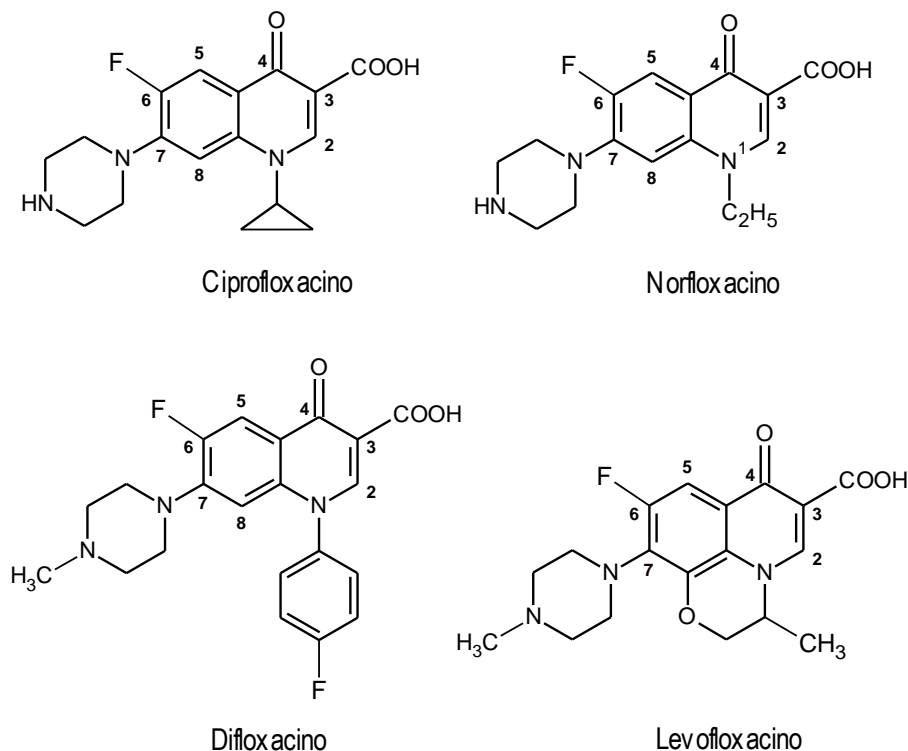


Figura 4.- Principales quinolonas de segunda generación.

Tercera generación (Figura 5): químicamente caracterizadas por la presencia de grupos cíclicos aminados en C7, siendo frecuentes la presencia de aminopirrolidinas y grupos azabíciclo, junto con la presencia de radicales en posición C5 y C8 (Tillotson, 1996; Gootz y Brighty, 1998).

Son una importante alternativa frente *Streptococcus pneumoniae*, incluyendo cepas resistentes a penicilina. Presentan una mayor actividad anti estafilocócica, pero no son útiles en infecciones producidas por *Staphylococcus aureus* metiliclin resistentes (Lowy, 1998).

También presentan una actividad levemente superior a las quinolonas de 2ª generación frente a anaerobios (Gootz y Brighty, 1998; Guinea y cols., 1995). Sin embargo, algunas de ellas fueron retiradas del mercado, después de aprobada su comercialización o se ha restringido su uso por sus efectos tóxicos (esparfloxacino, grepafloxacino) (Tálens-Visconti y cols., 2002).

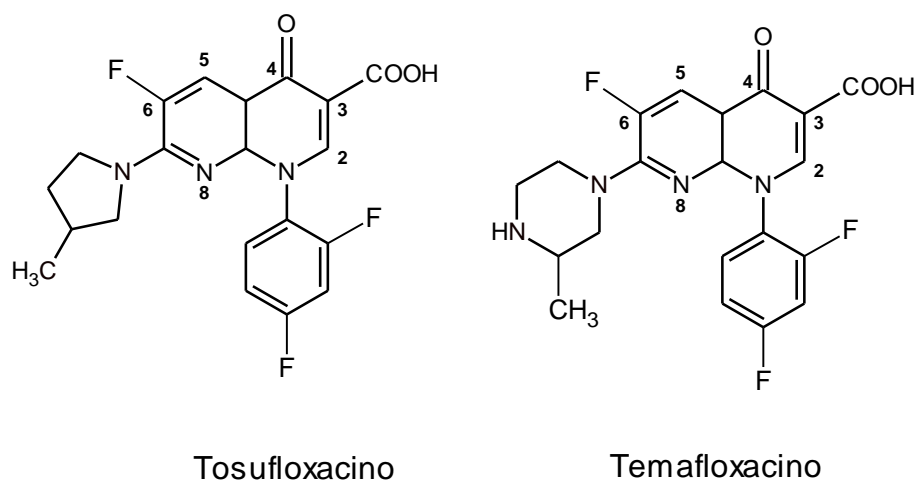


Figura 5.- Principales quinolonas de tercera generación.

Cuarta generación (Figura 6): presentan mayor actividad contra gérmenes anaerobios, utilizándose en infecciones polimicrobianas como las abdominales y ginecológicas (Gootz y Brighty, 1998; Gargallo-Viola y cols., 1991; Philips y cols., 1998; King y cols., 2000).

Algunas de ellas presentan actividad antitumoral, que se ha demostrado en animales de experimentación, lo cual posibilitaría su aplicación en el tratamiento de ciertos procesos tumorales (Tálens-Visconti y cols., 2002).

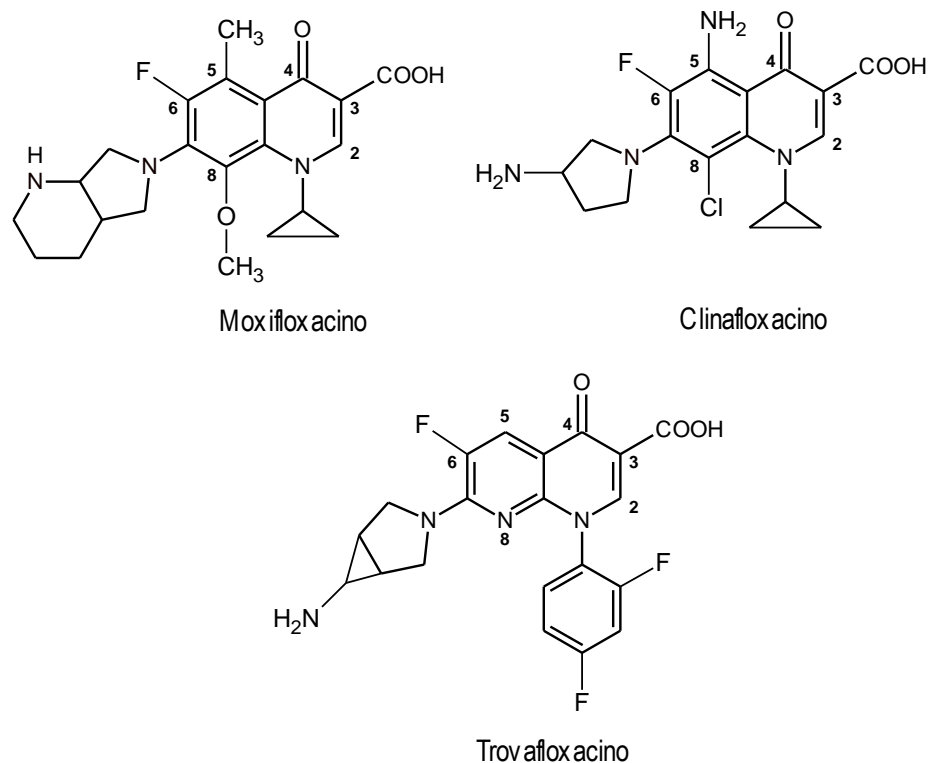


Figura 6.- Principales quinolonas de cuarta generación.

Estas quinolonas siguen siendo objeto de debate y motivo de investigación, tanto en lo referente a su aplicación clínica en el tratamiento de enfermedades infecciosas, como porque actúan sobre dianas de procariontas y eucariotas.

Se han desarrollado nuevas estructuras como las 6-desfluorquinolonas, sin átomo de flúor en posición 6, el cuál se había venido considerando imprescindible para un grado suficiente de actividad. Moléculas como garenoxacino y PGE 9262932 pertenecen a este grupo y se caracterizan por una aumentada actividad *in vitro*, espectro muy amplio y un reducido potencial de selección de resistencias (García y Muñoz, 2003).

Otro punto importante es la actividad frente a Gram negativos. Las nuevas moléculas desarrolladas mejoran discretamente su actividad frente a Enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores, siendo ciprofloxacino la fluoroquinolona de elección frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Es por ello que incrementar de forma significativa la actividad frente a Gram negativos es un objetivo deseable a conseguir (García y Muñoz, 2003).

2.3. RELACIÓN ESTRUCTURA ACTIVIDAD

Las fluoroquinolonas han experimentado una serie de cambios evolutivos muy significativos en la práctica clínica desde su introducción, hacia finales de 1980. Está disponible una gran cantidad de información acerca de los efectos en la actividad, farmacocinética, interacciones y reacciones adversas provocados por modificaciones estructurales en el núcleo y en los sustituyentes de las moléculas de fluoroquinolonas (Appelbaum y Hunter, 2000; Gobernado y Santos, 2002).

La estructura común a todos ellos, que parece necesaria para su actividad, y que por tanto no sufre modificaciones (su farmacóforo), contiene un nitrógeno trisustituido en la posición 1, un carbonilo en 4, un grupo carboxilo en 3 y un segundo ciclo condensado con este anillo de 4-piridona (Espada y Avendaño, 1993). Se cree que el ácido carboxílico en posición 3 y el oxígeno exocíclico en posición 4 conforman la porción de la molécula que se une a la ADN girasa bacteriana y que resulta esencial para el transporte intrabacteriano del antibiótico, por consiguiente, es vital no interferir en esta zona. La posición 2 está muy cercana al lugar de unión, por tanto, para no modificar la estereoquímica de la molécula a este nivel, las sustituciones en esta posición no se deben realizar con grupos voluminosos, además las modificaciones que se han realizado en esta posición no han supuesto un gran éxito.

La mejor actividad antibacteriana y el mayor espectro corresponden, para la mayoría de las quinolonas, a la incorporación de un átomo de flúor en la posición 6 de la molécula, y de un grupo piperacínico heterocíclico en la posición 7 (Appelbaum y Hunter, 2000; Gobernado y Santos, 2002). Estas modificaciones, como ya se ha comentado anteriormente, se introdujeron por primera vez con norfloxacin, y produjeron un verdadero avance en la terapéutica (Appelbaum y Hunter, 2000).

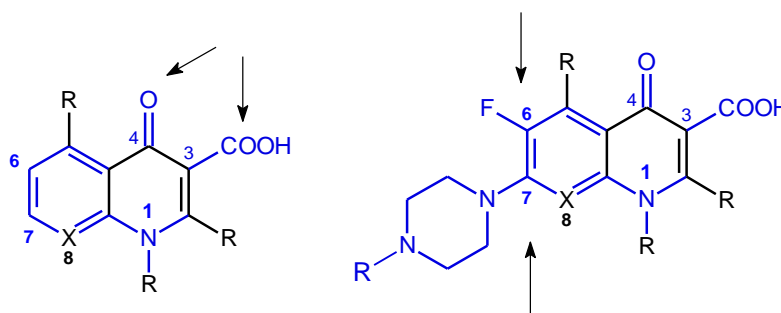


Figura 7.- Estructura común en el núcleo y sustituyentes que mejoran la actividad antibacteriana.

Actualmente, las diferentes estructuras de las 4-quinolonas comercializadas presentan espectro antibacteriano y características farmacocinéticas diferentes en función de las sustituciones realizadas en las posiciones de la molécula 2,4-dihidroquinoleína. Estas propiedades derivadas de las diferentes sustituciones son descritas en la tabla 1 (Appelbaum y Hunter (2000), Domagala (1994) y Gobernado y Santos (2002)).

Posición	Efecto en el espectro y características farmacocinéticas del fármaco
1	<p>La adición de una cadena lateral a través del nitrógeno, determina la estabilidad de la molécula y la potencia antibacteriana. Los primeros compuestos (ácido nalidíxico, ácido pipemídico, norfloxacin, etc.) poseen un grupo etilo en esta posición, que confiere estabilidad a la molécula. Al introducir un grupo voluminoso a través del nitrógeno surgen compuestos con mejoras en la actividad contra gram positivos y gram negativos. Un grupo ciclopropil provoca buena actividad contra gram negativos (ciprofloxacino, esparfloxacino, grepafloxacino, clinafloxacino, moxifloxacino, gatifloxacino y gemifloxacino).</p> <p>Con un anillo 2,4-difluoropentil en posición 1 se encuentran temafloxacino, tosufloxacino y trovafloxacino, incrementando éste último su actividad frente a gram positivos.</p> <p>En el caso de marbofloxacino el anillo es oxadiadiazina, que se supone que confiere a la molécula ventajas farmacocinéticas como mayor tiempo de eliminación y mayor volumen de distribución aparente.</p>
5	<p>La sustitución en esta posición está orientada a incrementar la actividad contra gram positivos pero está muy influenciada por la sustitución en otras posiciones. Grupos voluminosos reducen mucho la actividad, posiblemente por interferencias con el sitio activo de unión en 3-4.</p> <p>Otros sustituyentes empleados en posición 5 y que mejoran la actividad contra gram positivos son R = CH₃ (como en grepafloxacino) o R = NH₂ (como en esparfloxacino).</p>
6	El átomo de flúor en el C ₆ , o en el C ₉ , dependiendo si la quinolona es bicíclica o

	<p>tricíclica, controla la unión y efectos sobre el complejo ADN-girasa y la penetración intrabacteriana, aumentando notablemente la potencia, y fue el punto más importante en el desarrollo de las nuevas quinolonas.</p>
7	<p>Sustituyentes en C₇, controlan la farmacocinética, el espectro y la potencia antibacteriana.</p> <p>Anillos heterocíclicos de 5 ó 6 elementos, como piperacina, aumentan la potencia sobre gram negativos, y como pirrolidina, la aumentan sobre gram positivos.</p> <p><i>Compuestos con un anillo piperacina:</i> Norfloxacinó, enoxacino y ciprofloxacino, poseen el anillo no sustituido, mientras que grepafloxacino, lomefloxacino y fleroxacino presentan un anillo 3-metilpiperacina. Ofloxacino y levofloxacino poseen una 4-metilpiperacina, y esparfloxacino tiene una 3,5-dimetilpiperacina. Estas sustituciones en la piperacina suponen mayor actividad contra gram positivos, y pueden aumentar la penetración a través de la pared celular.</p> <p><i>Compuestos con un anillo pirrolidina:</i> Las aminopirrolidinas también aumentan la actividad antibacteriana, generalmente la mejoran frente a gram positivos, aunque esta actividad disminuye si el anillo no contiene el grupo amino. Tosufloxacino y clinafloxacino tienen un anillo 3-aminopirrolidina. Sitafloxacino un grupo 3-amino-4-ciclohexil, y gemifloxacino posee un grupo aminometilo y un sustituyente 4-metiloximino. Todos ellos tienen una excelente actividad frente a gram positivos.</p>
8	<p>La sustitución en esta posición afecta las propiedades farmacocinéticas y a la actividad antibacteriana, particularmente frente a especies anaerobias. Las naftiridonas tienen un <i>nitrógeno</i> en lugar de un carbono en el anillo (enoxacino, tosufloxacino, trovafloxacino y gemifloxacino). Los sustituyentes en posición 8 del anillo que favorecen la actividad antibacteriana son los <i>halógenos</i> (cloro y flúor). Pero muchas 8-cloroquinolonas (Bay 3118) presentan pobre estabilidad a la luz ultravioleta y mayor incidencia de fototoxicidad, pese a tener una excelente actividad. Asimismo las 8-fluoroquinolonas presentan fototoxicidad (esparfloxacino, fleroxacino y lomefloxacino). Por ello, lomefloxacino ha sido retirado y se ha limitado el uso de esparfloxacino y fleroxacino.</p> <p>Un grupo <i>metoxi</i> confiere una buena actividad contra anaerobios y parece no</p>

	acompañarse de fototoxicidad (moxifloxacino y gatifloxacino). Otra posibilidad es <i>no sustituir</i> ésta posición (norfloxacino, pefloxacino, ciprofloxacino y grepafloxacino).
--	---

Tabla 1.- Propiedades derivadas de las diferentes sustituciones en las fluoroquinolonas (Appelbaum y Hunter (2000), Domagala (1994) y Gobernado y Santos (2002)).

La molécula de **marbofloxacino** es 9-fluoro- 2,3-dihidro- 3 metil- 10 (4-metil-1-piperacínil)- 7-oxo- 7H pirido (3,2,1-ij) (4,1,2) benzoxadiacina- 6 ácido carboxílico. Es una fluoroquinolona desarrollada exclusivamente para uso veterinario. Difiere de la molécula de enrofloxacino, quinolona también de uso veterinario, en el anillo de oxadiadiazina, que se supone que confiere a la molécula ventajas farmacocinéticas como mayor tiempo de semivida y mayor volumen de distribución (Marín y cols, 2009). En la práctica, estas características permiten la administración cada 24 horas manteniendo concentraciones por encima de la CMI durante más de 12 horas (Haritova y cols., 2006)

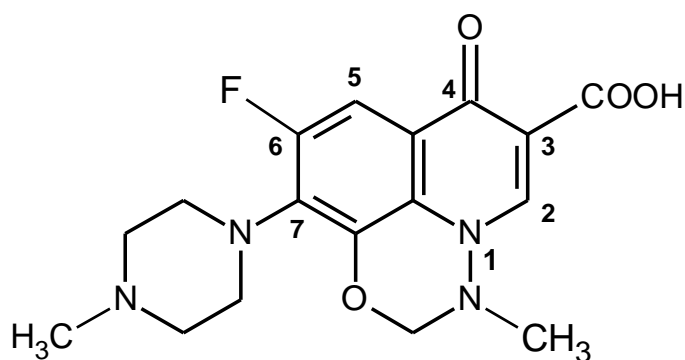


Figura 8.- Estructura de Marbofloxacino.

2.4. - Propiedades físicas y químicas

Las quinolonas son sustancias cristalinas, de color blanco amarillento o amarillo pálido, poco solubles o insolubles en agua a pH neutro y en solventes orgánicos, solubles en soluciones ligeramente alcalinas o ácidas y termorresistentes, por lo que pueden esterilizarse en autoclave. Son ácidos orgánicos con un pK_a elevado (Gobernado y Santos, 2002), fotosensibles y muy

estables a temperatura ambiente, sin pérdidas apreciables de su actividad, ni de sus propiedades físico-químicas al cabo de dos años (Dámaso, 1990).

Presentan grupos potencialmente ionizables. Las quinolonas como el ácido nalidíxico, flumequina y ácido oxolínico solo tienen un grupo relevante ionizable que es el grupo 3-carboxilo. Ofloxacino, norfloxacino y enoxacino, entre otros, tienen dos grupos ionizables, el 3-carboxilo y el sustituyente del N-4 de la piperazina (Hyoung-Ryun y cols., 2002). A continuación (Tabla 3) se muestran constantes de ionización de algunas quinolonas, medidas a través de métodos espectrofotométricos y cromatográficos (Martínez y cols., 2006).

QUINOLONAS	pKa ₁	pKa ₂
Ciprofloxacino	6,0	8,8
Difloxacino	6,1	7,6
Enoxacino	6,0	8,5
Enrofloxacino	6,0	8,7
Fleroxacino	5,7	8,0
Lomefloxacino	5,8	9,3
Norfloxacino	6,4	8,7
Ofloxacino	6,1	8,2
Pefloxacino	6,3	7,6
Sarafloxacino	6,2	8,6
Temafloxacino	5,6	8,8
Marbofloxacino	5,7	8,0

Tabla 2.- Constantes de ionización de diferentes quinolonas. pKa₁: constante de ionización del grupo 3-carboxílico; pKa₂: constante de ionización del grupo N-4 piperazínico

Las fluoroquinolonas poseen un grupo carboxílico de carácter ácido y un grupo amino de carácter básico y por tanto son moléculas anfóteras (Orero y cols., 2002). Con algunas excepciones, las fluoroquinolonas presentan pobre solubilidad en agua, entre pH 6 y 8. Dentro

de este rango, tienen baja solubilidad en agua y tienen predisposición a precipitar en soluciones más ácidas (Jenkins y Friedlander, 1988). En seres humanos y en animales se ha observado cristalluria en algunos casos lo que probablemente sea consecuencia de esta predisposición a precipitar en medio ácido (Ball, 1986). En función del pH extracelular se pueden encontrar cuatro formas (Figura 9):

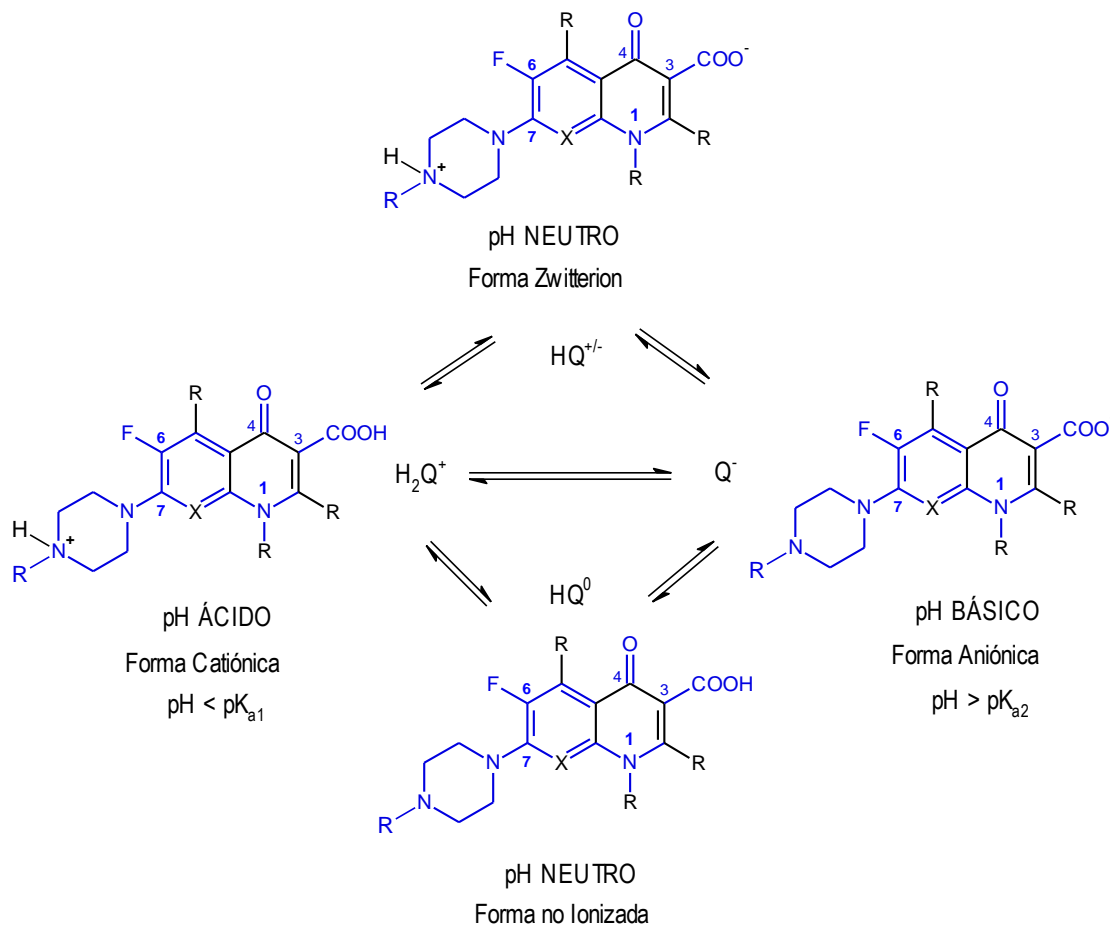


Figura 9.- Equilibrios de ionización para las fluoroquinolonas en función del pH extracelular.

Así, a pH por debajo de pK_{a1} las quinolonas presentan carga positiva, mientras que a pH por encima de pK_{a2} tienen carga negativa. Valores bajos de pK_a determinan el rango de pH dentro del cual estos antibacterianos son solubles en fluidos acuosos, siendo este dato importante para la disolución de suspensiones y tabletas (Martínez y cols., 2006).

Por tanto, el pH extracelular es un factor fundamental a tener en cuenta en los estudios de incorporación al interior celular. A pH fisiológico, las quinolonas presentan una forma no ionizada que les permite difundir pasivamente a través de la membrana plasmática en mayor o menor grado (Orero y cols., 2002; Michot y cols, 2005), pero presentan una baja solubilidad en fluidos acuosos (Martínez y cols., 2006). Es por ello que las formulaciones líquidas de varias quinolonas para administración oral o parenteral contienen sales solubles libres en soluciones acuosas. Las formulaciones sólidas contienen el principio activo en su forma betaína o a veces en forma de sal de hidrocloreuro (Merck Veterinary Manual, 1998).

Por otro lado, se ha demostrado en estudios previos, que el coeficiente de reparto octanol/agua, P_{app} , tiene influencia sobre las concentraciones del fármaco dentro de los microorganismos. De forma que en Gram positivos, cuanto mayor sea P_{app} (más liposoluble) más concentración se alcanza dentro de la bacteria, sin embargo, en Gram negativos la concentración de fármaco aumenta cuanto menor sea P_{app} (menos liposoluble) (Piddock, 1999).

La penetración, acumulación y localización de los antimicrobianos en el interior de las células fagocíticas son conceptos a tener en cuenta en terapéutica antimicrobiana. Para cuantificar el grado de penetración de un antimicrobiano se usa la relación entre la concentración intracelular y la extracelular del mismo (I/E). En las fluoroquinolonas, este cociente oscila entre 2 y 28, dependiendo del tipo de célula, del fármaco y de otros factores como el método utilizado (Gobernado, 2001). En la Tabla 3 se aprecia mediante el valor que adquiere el cociente I/E, la penetración de diferentes quinolonas en los polimorfonucleares (Gobernado, 2001):

Quinolona	Polimorfonucleares
Ácido pipemídico	2,4
Norfloxacinó	2,2-5,7
Ciprofloxacino	4-7
Levofloxacino	6,7-9,8

Tabla 3.- Penetración de diferentes quinolonas en polimorfonucleares, según el valor adquirido del cociente I/E.

2.5. MECANISMO DE ACCIÓN.

Este grupo de compuestos actúa sobre los microorganismos sensibles produciendo, esencialmente, un efecto bactericida a dos o cuatro veces la CMI (Gobernado y Santos, 2002).

Para encontrar su “diana”, estos quimioterápicos tienen que penetrar en el interior de la célula bacteriana. En las bacterias gram negativas, las quinolonas penetran a través de los canales acuosos transmembrana de las porinas, y luego por difusión simple atraviesan el peptidoglicano y la membrana citoplasmática. La entrada es pasiva, sin consumo de energía, y no saturable. Es probable que además, las quinolonas hidrófobas puedan atravesar la membrana externa en función de su liposolubilidad. En las bacterias gram positivas, que no tienen porinas ni polisacáridos, el paso es por difusión simple (Chapman y Georgopapadakou, 1988; Gobernado y Santos, 2002; Nikaido y Thanassi, 1993; Ruiz, 2003).

Posteriormente, y una vez dentro de la bacteria, la principal diana es la inhibición de dos topoisomerasas la tipo II o girasa del ADN y la topoisomerasa IV. La girasa del ADN o topoisomerasa II, fue el primer blanco identificado, por ello también se denomina a estos quimioterápicos “inhibidores de la girasa”.

- Estructuralmente la girasa del ADN contiene dos subunidades A y otras dos subunidades B. Las subunidades A son proteínas codificadas por el gen *gyrA* (inicialmente denominado “nal” A porque se describió en estudios realizados con el ácido nalidixico), mientras que las dos subunidades B, que son igualmente proteínas, son codificadas por el gen *gyrB* (primariamente llamado “cou” al describirse en ensayos efectuados con la coumermicina A) (Dámaso, 1990; Hooper, 2001).

- Estructuralmente la topoisomerasa IV es también un tetrámero, C_2E_2 , formado por dos subunidades C y dos E, codificadas por los genes *parC* y *parE*, respectivamente (Bearden y Danziger, 2001). Los aminoácidos codificados por los genes *parC* y *parE* son homólogos a los codificados por *gyrA* y *gyrB*. Esta similitud en la secuencia de aminoácidos entre la ADN girasa y la topoisomerasa IV (especialmente en las posiciones productoras de resistencia en la subunidad A de la girasa), implica que estos compuestos pueden inhibir la actividad de la topoisomerasa IV y la de la ADN girasa, aunque no con la misma intensidad (Azanza y cols., 2003; Schedletzky y cols., 1999; Taléns-Visconti y cols., 2002).

El ADN en las bacterias está densamente empaquetado, y estas dos enzimas, girasa del ADN y topoisomerasa IV, están involucradas en el proceso de replicación, recombinación y

reparación del ADN de la bacteria. Sus funciones se detallan a continuación (Aktipis, 2000; Dougherty y cols., 2001; Schedletzky y cols., 1999):

- Topoisomerasa II o ADN girasa: Introduce superenrollamientos negativos en el ADN; relaja el ADN superenrollado positiva o negativamente. En concreto, los monómeros A llevan a cabo los cortes en puntos determinados de la molécula de ADN (Taléns-Visconti y cols., 2002).
- Topoisomerasa IV: Relaja el ADN; separa los dos cromosomas que permanecen encadenados al final de la replicación; pero no puede introducir superenrollamiento negativo.

La ADN girasa y la topoisomerasa IV actúan mediante la fijación a una molécula de ADN, y realizan sus funciones a expensas de ATP; es decir éstas topoisomerasas son ATPasas (Aktipis, 2000).

Las quinolonas, se unen a la subunidad A de la ADN girasa, a través de un residuo de tirosina, e impiden el cierre de los cortes producidos en el ADN. Los estudios sobre la cinética de unión de las fluoroquinolonas a la ADN girasa sugieren que cuatro moléculas se unen estereoquímicamente a la diana en una unión cooperativa (Lees, 2002b; Shen y cols., 1989b).

La inhibición de estas enzimas se realiza a través de la formación de un complejo ternario entre quinolona, enzima y ADN, aunque también se puede formar primero un complejo no intercalante con ADN, al que posteriormente se unirá la enzima (Espada y Avendaño, 1993; Shen y cols., 1989a).

El proceso celular que actúa en el complejo ternario formado *in vivo* produce, un bloqueo del movimiento de la horquilla de replicación, una inhibición de la síntesis de ADN rápida y reversible con cese del crecimiento (acción bacteriostática) y una rotura irreparable de la doble hélice de ADN (Hiasa y cols., 1996; Hooper, 2000a). La molécula de ADN, demasiado extendida, no tiene espacio suficiente en el interior de la célula bacteriana (Dámaso, 1990). Posteriormente, la muerte de la bacteria (acción bactericida) tiene lugar, de forma rápida, por la síntesis de exonucleasas (Dámaso, 1990; Gobernado y Santos, 2002).

En general, se acepta que las quinolonas ejercen su actividad a través de la girasa en las bacterias gram negativas, mientras que en las gram positivas su primera diana es la topoisomerasa IV (Schedletzky y cols., 1999; Stein, 2000; Taléns-Visconti y cols., 2002); sin embargo, en *S. pneumoniae* la actividad bactericida puede producirse a través de la girasa, la

topoisomerasa IV o ambas, dependiendo de la estructura de la quinolona. Este hecho apunta a que la relación entre estructura y actividad puede ser diferente para cada especie bacteriana, según la actividad se produzca sobre una u otra enzima o en ambas (Taléns-Visconti y cols., 2002).

Otras consecuencias, demostradas con quinolonas son que:

- 1. Al actuar sobre las bacterias se liberan polisacáridos, probablemente por alteraciones en la formación del peptidoglucano en la pared celular, con aumento de la hidrofobicidad de la superficie celular, mayor permeabilidad para la entrada de los antibióticos betalactámicos, vulnerabilidad a otros fármacos, y mejor lisis de los detergentes; además los microorganismos se vuelven más sensibles a la acción del complemento sérico C₃, aumentando la capacidad fagocítica de los macrófagos alveolares y polimorfonucleares (Gobernado y Santos, 2002).

- 2. La bacteria responde a la inhibición de la ADN-girasa con una autoprotección hacia la replicación del ADN que es atacado, lo que se denomina respuesta SOS, que se puede medir por el aumento de la producción de β-galactosidasa, y que explica las formas filamentosas que adquieren las bacterias gram negativas después de haber estado en contacto con las quinolonas (Gobernado y Santos, 2002).

- 3. La acción bactericida se observa principalmente en el caso de las fluoroquinolonas, siendo además bifásica, es decir, para cada quinolona existe una concentración bactericida máxima por encima de la cual la actividad disminuye, pero que vuelve a aumentar si se incrementa más la concentración. Esta característica parece que se explica por el hecho de que con ciertas concentraciones la acción bacteriostática impide la síntesis de proteínas que participan en la acción bactericida. Este hecho no es aplicable a moxifloxacino, el cuál tiene un marcado efecto bactericida dependiente de la concentración, y que no es bifásico como el de otras fluoroquinolonas (Durham y cols., 2000).

Por lo anteriormente citado, no es recomendable la utilización conjunta de las quinolonas con sustancias que inhiban la síntesis proteica o el ARN bacteriano (rifampicina, cloranfenicol y tianfenicol), ya que puede reducirse de forma significativa la actividad bactericida. *In vitro* se han observado interacciones antagónicas entre ciprofloxacino y cloranfenicol, y en medicina humana entre ciprofloxacino y rifampicina (Walker, 2000). Ofloxacino y moxifloxacino no experimentan

este antagonismo, lo que hace pensar que ambos poseen - además del mecanismo común a las quinolonas - otro mecanismo diferente (Boswell y cols., 1999; Dámaso, 1990).

En resumen, las quinolonas actúan en cuatro etapas: a) paso al interior celular, b) bloqueo de la diana (inhibición de la síntesis de ADN y proteica), c) inducción de la respuesta SOS y autolisinas (alteraciones de la pared celular) y d) muerte celular (Gobernado y Santos, 2002).

2.6. - EFECTO POSTANTIBIÓTICO DE LAS QUINOLONAS

El efecto postantibiótico (EPA), es el término utilizado clásicamente para describir la persistencia en la supresión del crecimiento bacteriano que se mantiene tras una corta exposición del microorganismo a los agentes antimicrobianos (Boswell y cols., 1999; Chan y cols., 2004; Gobernado y Santos, 2002; Pastor y Cantón, 1999). Bigger, en 1944, fue el primero en demostrar que las bacterias gram positivas, tras ser expuestas a la acción de la penicilina, no recobraban su crecimiento normal hasta transcurridas algunas horas después de haber sido eliminado por completo el antibiótico (Pastor y Cantón, 1999).

El efecto postantibiótico se demuestra por seguimientos microbiológicos de la cinética de crecimiento después de la eliminación del antimicrobiano (Gobernado y Santos, 2002). Actualmente, se aceptan definiciones distintas en función de las condiciones en las que se determina el efecto postantibiótico. Así, se encuentra el "efecto postantibiótico *in vitro*" o periodo de tiempo durante el cual no existe crecimiento bacteriano tras una breve exposición de los microorganismos al antimicrobiano y "efecto postantibiótico *in vivo*" o la diferencia en tiempo que se establece, para que el número de bacterias se incremente $1\log_{10}$, entre los animales del grupo control y los tratados, cuando la concentración del antimicrobiano en plasma o en el lugar de la infección desciende por debajo de la CMI (Mouton y cols., 2005).

La observación de las bacterias por microscopía electrónica, durante el tiempo que dura la fase EPA, ha puesto de manifiesto que las células están alteradas morfológicamente, adoptando formas globosas o filamentosas, después de la exposición al antimicrobiano. Ciprofloxacino produce una hinchazón de las bacterias con formación de vacuolas en el citoplasma en la mayoría de los *S. aureus* durante la fase EPA (Pastor y Cantón, 1999).

El efecto postantibiótico puede ser consecuencia de:

- La alteración de los factores de virulencia bacteriana, como la alteración de la actividad hemolítica observada sobre *E. coli* en presencia de quinolonas; la disminución de la síntesis de proteasas y exotoxina A de *P. aeruginosa* tras la exposición a concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacino o la disminución de la adherencia de la bacteria a las células eucariotas inducida por las fluoroquinolonas (Pastor y Cantón, 1999; Lees, 2002b).

- La inhibición de la bomba de eflujo, que ha sido demostrada durante la fase de EPA (Lees, 2002b). Ello se debe a que después de la exposición a las quinolonas, las bacterias tienen reducido su metabolismo y no son capaces de generar suficiente energía para expulsar al antimicrobiano de la célula mediante los sistemas de eflujo (Pastor y Cantón, 1999).

Las quinolonas producen un efecto postantibiótico de duración variable, tanto sobre bacterias gram positivas, como sobre bacterias gram negativas. Sobre las bacterias gram positivas los EPA inducidos suelen ser, por lo general, intermedios en duración (90 y 180 minutos). Las quinolonas producen efectos postantibióticos inferiores a 3 horas sobre *S. aureus*, con la excepción de esparfloxacino y ofloxacino, que son las quinolonas que inducen los EPA más largos, de 2 a 5 horas de duración. Pefloxacino genera un EPA menor de 90 minutos y norfloxacino induce un efecto postantibiótico aún más corto (<60 minutos). Sobre las bacterias gram negativas, las quinolonas inducen efectos postantibióticos intermedios (de 1,5 a 3 horas), a excepción de ciprofloxacino frente a *Enterobacter aerogenes* y lomefloxacino frente a *Escherichia coli*, para los que se ha observado un efecto postantibiótico siempre menor de 1,5 horas (Gobernado y Santos, 2002).

Marbofloxacino muestra efecto postantibiótico significativo en bacterias gram-negativas y gram-positivas cuando se alcanzan previamente concentraciones iguales o superiores a la CMI (concentración mínima inhibitoria), y es activo tanto en la fase estacionaria como en la fase de crecimiento de la replicación bacteriana. Generalmente, el efecto postantibiótico aumenta conforme aumenta la concentración y la muerte de la bacterias ocurre dentro de los treinta minutos posteriores a la exposición (Plumb, 2010).

2.7. INTEGRACIÓN FARMACOCINÉTICA – FARMACODINÁMICA.

La integración farmacocinética-farmacodinámica en antibacterianos hace referencia al conjunto de ratios/relaciones entre parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos, cuyo valor se utiliza para predecir la aparición de mutantes resistentes y/o el éxito clínico en el tratamiento de una infección. En 1987, Blaser y cols., ya establecen la utilidad de éstos parámetros, concretamente la del ratio entre la concentración máxima y la concentración mínima inhibitoria ($C_{m\acute{a}x}/CMI$), como predictor de la aparición de resistencias en cepas de *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. coli* y *P. aeruginosa* frente a quinolonas (enoxacino), cuando este parámetro no alcanza valores iguales o superiores a 8. En 1996, Madaras-Kelly y cols., comparan en un modelo *in vitro* el comportamiento de ciprofloxacino y ofloxacino frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Los resultados del estudio señalaron que:

- a) Pese al mejor perfil farmacocinético de ofloxacino (mayor semivida, $t_{1/2}$, mayor área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo, AUC, y $C_{m\acute{a}x}$ alcanzada), éste mostraba menor actividad que ciprofloxacino, a consecuencia de presentar valores más altos de CMI frente a *P. aeruginosa*, y
- b) que el área bajo la curva bactericida (eficacia antibacteriana) se correlacionaba de una forma pobre con el área bajo la curva, AUC ($r = 0,04$), mientras que se obtenía una buena correlación con el ratio AUC/CMI ($r = 0,80$).

A la vista de estos resultados, los autores del estudio concluyeron que para comparar la eficacia entre las distintas quinolonas, se necesitaban parámetros híbridos, como el ratio AUC/CMI, que incorpora características farmacocinéticas y características de sensibilidad bacteriana (farmacodinámicas).

Por otro lado, la eficacia de un antibacteriano depende principalmente de tres factores (Quintiliani, 2004):

1. La capacidad del fármaco para unirse a su diana en la bacteria, evitando los posibles mecanismos de resistencia (bombas de eflujo, enzimas que destruyan al propio fármaco y/o dianas que modifiquen su configuración molecular).
2. La concentración del antibacteriano.
3. La persistencia en el lugar de acción, es decir, que el fármaco esté el periodo de tiempo suficiente para inhibir los procesos metabólicos de la bacteria.

Por tanto, para poder evaluar la eficacia de los antibacterianos, actualmente, se aceptan una serie de principios farmacocinéticos y farmacodinámicos que ayudan a predecir su potencia y el régimen de administración más adecuado y que tienen en consideración el factor concentración y el factor tiempo (Quintiliani, 2004).

Así, los antibacterianos pueden dividirse principalmente en dos grupos, ya propuestos en 1976 por Shah y cols. (Craig, 1998; Andes y Craig, 2002a):

1. Aquellos que producen la muerte bacteriana de forma dependiente del tiempo de exposición.
2. Aquellos en los que la actividad es dependiente de la concentración alcanzada en el lugar de acción.

Si bien esta clasificación no es absoluta, de hecho, se ha descrito un tercer grupo con un patrón de actividad al que pertenecen antibacterianos con actividad tiempo dependiente pero con efectos persistentes, y que poseen la característica de que concentraciones altas de fármaco no aumentan la muerte bacteriana, pero si que provocan una supresión prolongada del crecimiento bacteriano (AliAbadi y Lees, 2000). Antibióticos pertenecientes a este tercer grupo serían azitromicina, clindamicina y las tetraciclinas (Andes y Craig, 2002a).

2.7.1.- ANTIBACTERIANOS TIEMPO DEPENDIENTE Y CONCENTRACIÓN DEPENDIENTE.

El grupo de antibacterianos tiempo dependiente, o antimicrobianos que producen la muerte bacteriana de forma dependiente del tiempo de exposición, y al que pertenecen β -lactámicos, linezolid, eritromicina y claritromicina, ha demostrado en modelos experimentales, que la mejor relación entre su actividad y la muerte bacteriana se consigue cuando se mantiene durante todo el intervalo posológico una concentración de antibiótico por encima de la CMI ($T > CMI$). Elevaciones de la concentración muy por encima de la CMI no se correlacionan con una mayor tasa de muerte bacteriana. La duración real en la que la concentración plasmática del fármaco debe estar por encima de la CMI no se conoce para todos los agentes antimicrobianos, para penicilinas, cefalosporinas y macrólidos este periodo de tiempo necesario para lograr la eficacia bacteriana es del 60%-70% del intervalo posológico (Craig, 2001; McKellar y cols., 2004).

Respecto a los antibacterianos con actividad concentración dependiente, o actividad dependiente de la concentración, como aminoglucósidos, quinolonas, ketólidos y metronidazol, se consigue una mayor tasa de muerte bacteriana cuanto mayor es su concentración en contacto con las bacterias. Los dos parámetros farmacocinético-farmacodinámicos (PK-PD), por tanto, que mejor se correlacionan con su eficacia son el ratio de concentración plasmática máxima $C_{m\acute{a}x}/CMI$ y el ratio área bajo la curva AUC/CMI . El mejor régimen de dosificación para estos fármacos será el que consiga mayores picos de concentración. Esto explicaría los buenos resultados obtenidos con los esquemas de dosificación de dosis única diaria para aminoglucósidos, así como los intervalos de dosificación de 12-24 horas para quinolonas (Drusano y cols., 1993). Además, otro aspecto que justifica la administración en intervalos prolongados de estos antimicrobianos, en nuestro caso las fluoroquinolonas, es que presentan un efecto postantibiótico prolongado frente a bacterias gram negativas y positivas, que permite inhibir el crecimiento bacteriano con concentraciones plasmáticas inferiores a la CMI. Los ratios establecidos como "óptimos" son unos valores de $AUC_{24}/MIC_{90} \geq 100-125$ h y $C_{m\acute{a}x}/MIC_{90} \geq 8-10$ (McKellar y cols., 2004).

2.7.2.- PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS-FARMACODINÁMICOS. EXTRAPOLACIÓN ENTRE ESPECIES ANIMALES.

Experiencias realizadas en modelos animales, que emplean regímenes de dosis múltiples, han identificado al ratio AUC/CMI como el parámetro que mejor predice la eficacia, y al ratio $C_{m\acute{a}x}/CMI$ como un muy buen parámetro predictor de la prevención de aparición de resistencias (Andes y Craig, 2002b).

Los parámetros que mejor se correlacionan con el éxito del tratamiento para fluoroquinolonas han sido descritos en varios estudios, entre ellos destacar a Craig (1998), que describe, tras realizar experiencias en modelos con ratones, que la ratio AUC/CMI es el parámetro que mejor se correlaciona con la eficacia de las quinolonas, y que son necesarios valores del mismo iguales o superiores a 35 para producir un efecto bacteriostático; aunque un valor igual o superior a 100 se asocia a una mortalidad de aproximadamente cero. Forrest y cols. (1993), hallaron resultados similares con ciprofloxacino intravenoso en pacientes críticos que padecían neumonía nosocomial, señalando valores superiores a 125 como aceptables. Sin embargo, otros autores concluyen que el valor del parámetro AUC/CMI necesario para tratar las

infecciones respiratorias de la comunidad es menor (Odenholt, 2002), como el valor de AUC/CMI igual a 35-63, descrito por Zhanel y cols. (2001) en un modelo *in vitro* con distintas fluoroquinolonas frente a *Streptococcus pneumoniae*.

Al utilizar las fluoroquinolonas se deben lograr $C_{m\acute{a}x}/CMI$ o bien AUC/CMI muy altas, y en general se recomienda el uso de dosis altas espaciadas. Forrest y cols. (1993), describen en pacientes críticos, que conforme aumenta el valor de AUC/CMI de ciprofloxacino, se obtiene una mayor rapidez en la consecución del éxito clínico (AUC/CMI = 125: curación en 32 días; AUC/CMI = 125-250: en 6,6 días; AUC/CMI > 250: en 1,9 días). Por tanto, dosis elevadas pueden reducir la duración del tratamiento con quimioterápicos. Así, dosis de 750 mg de levofloxacino administradas una vez al día durante 5 días muestran una eficacia y perfil de tolerancia similar a 500 mg una vez del mismo fármaco administrado cada 24 horas durante 10 días en el tratamiento de la neumonía adquirida en la comunidad (Dunbar y cols., 2003). Ahora bien, no hay evidencia de que una vez que se hayan alcanzado los valores de AUC/CMI, $C_{m\acute{a}x}/CMI$ y $T > CMI$ buscados, valores más elevados repercutan en una mayor rapidez en la acción bactericida o en una menor aparición de resistencias, mientras que si que se ha evidenciado la aparición de reacciones adversas con concentraciones en plasma excesivamente altas (Quintiliani, 2004).

Un aspecto interesante es que corrigiendo las diferencias existentes entre distintas especies animales, a partir de estudios realizados con modelos animales *in vivo* se puede extrapolar y determinar el valor del parámetro PK-PD ($T > CMI$ y ratios AUC/CMI, $C_{m\acute{a}x}/CMI$) necesario para obtener eficacia antimicrobiana y minimizar la aparición de resistencias (Andes y Craig, 2002a; Toutain y Lees, 2004). Estas extrapolaciones pueden realizarse siempre y cuando la potencia del fármaco no dependa de la especie y cuando se obtenga en dos o más especies el mismo efecto a partir de la misma exposición al fármaco, entendida como misma AUC (Toutain y Lees, 2004). Además, dichas extrapolaciones deben realizarse con precaución, ya que diversas experiencias publicadas, han utilizado ratones neutropénicos o pacientes comprometidos inmunológicamente, y por tanto, los ratios descritos son diferentes a los que se obtendrían en las mismas especies inmunológicamente competentes (Andes y Craig, 2002a).

2.7.3.- LIMITACIONES

En la integración PK-PD hay que tener en cuenta varias limitaciones (Andes y Craig, 2002):

1. Los parámetros farmacodinámicos (CMI) se obtienen *in vitro*. Por tanto, el pH, la presencia de oxígeno y el número de microorganismos no van a ser iguales en el medio de cultivo que en el ambiente donde crece el microorganismo *in vivo*: sangre, leche, líquido extracelular e intracelular, etc. Y que además se va a subestimar la duración del efecto postantibiótico.

2. Los parámetros farmacocinéticos (AUC, $C_{m\acute{a}x}$) se deben obtener de la concentración en la biofase, lo cual resulta complicado. Si no existen barreras que impidan la difusión del fármaco, la concentración del fármaco libre en plasma, se aproxima a la concentración del fármaco en el espacio extracelular. Por tanto, la concentración del antibacteriano no unido a proteínas plasmáticas es el mejor predictor del éxito clínico, incluso para las infecciones en tejidos. Sin embargo, cuando (McKellar y cols., 2004; Toutain y cols., 2002):

A). Existe una barrera que dificulte la difusión del antibacteriano (como ocurre con el sistema nervioso central, próstata, ojos),

B) En aquellos casos en los que exista menor riego sanguíneo (abscesos), o

C) Cuando se necesite alcanzar una concentración intracelular elevada, porque la infección esté causada por patógenos intracelulares (micoplasmas, clamidias...) la concentración plasmática puede no resultar tan útil para predecir las concentraciones en el lugar de infección o biofase, y es cuando no se va a obtener una buena correlación entre los parámetros farmacocinéticos y la respuesta farmacológica, si no se obtienen las concentraciones en dicha biofase. La fracción libre del antibacteriano debe ser similar en plasma y en el líquido extracelular, pero esto no sucede en el caso en que el antibacteriano se una a proteínas plasmáticas de forma importante (fracción libre menor del 20%), por lo que para poder realizar los cálculos farmacocinéticos-farmacodinámicos se debe de aplicar un factor de corrección (Toutain y cols., 2002).

2.7.4.- VENTANA DE SELECCIÓN DE MUTACIONES Y CONCENTRACIÓN PREVENTIVA DE MUTANTES

Recientemente, se han incorporado nuevos conceptos en este campo. Como la ventana de selección de mutaciones (VSM) o intervalo comprendido entre la concentración mínima inhibitoria (límite inferior) y la concentración preventiva de mutantes (CPM, límite superior) para un microorganismo determinado (Mouton y cols., 2005; Croisier y cols., 2004). La concentración preventiva de mutantes (CPM) es la concentración que previene el crecimiento de microorganismos, en determinaciones en las que se utilizan inóculos con elevadas cantidades de bacterias ($\geq 10^9$), empleando el método de dilución en agar (Mouton y cols., 2005). La concentración preventiva de mutantes hace referencia a la concentración que previene el crecimiento de mutantes resistentes de primer escalón, o concentración de antibacteriano que únicamente permite el crecimiento de microorganismos que poseen dos mutaciones simultáneamente (Blondeau y cols., 2004).

Estos parámetros se utilizan como predictores de la aparición de mutantes resistentes, en función de la exposición que pueda sufrir una población determinada de microorganismos a concentraciones de antibacteriano pertenecientes a la ventana de selección de mutantes (Croisier y cols., 2004).

En el caso de marbofloxacino, se conoce que las resistencias adquiridas son debidas a mutación cromosómica, de manera particular con *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter spp* y enterococos, aunque se considera que la resistencia mediada por plásmidos sólo ocurre en situaciones especiales. Desde 1997, la sensibilidad de los patógenos diana a marbofloxacino se mantiene muy alta (Plumb, 2010).

La concentración mínima inhibitoria (CMI), o concentración más baja de un antimicrobiano necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano *in vitro* cuando se ensayan de 10^4 a 10^5 células bacterianas, no siempre permite conocer la existencia de pequeñas cantidades de mutantes resistentes en la población bacteriana, teniendo en cuenta que en ocasiones se encuentran de 10^9 a 10^{10} células bacterianas, en el lugar de la infección (Epstein y cols., 2004).

Además, se ha observado que el periodo de tiempo en el que las concentraciones plasmáticas son elevadas, es un factor importante en la aparición de mutantes resistentes, y por tanto, no se considera suficiente el conocimiento de la ratio $C_{m\acute{a}x}/CMI$ (Blondeau y cols., 2001).

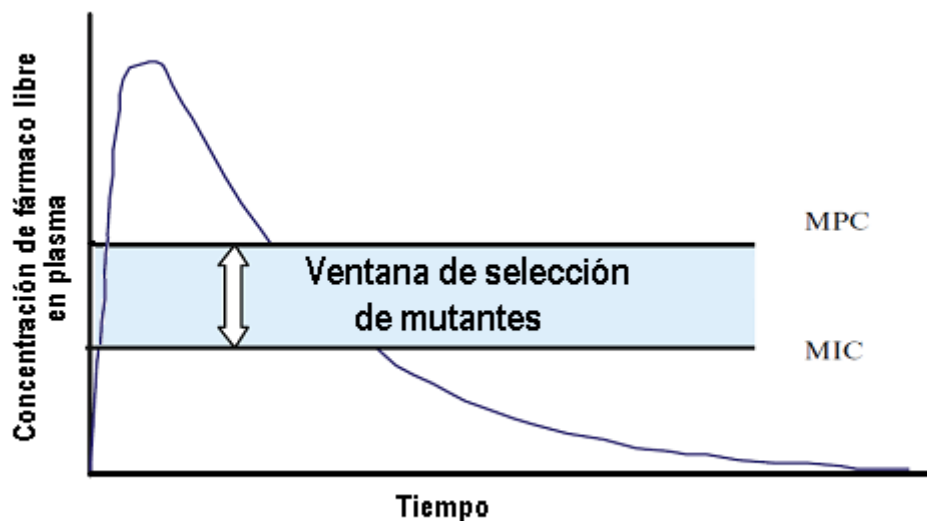


Figura 10.- Representación esquemática de la ventana de selección de mutantes donde quedan definidos el límite inferior MIC, y el límite superior MPC respectivamente.

Conociendo la cinética de un antimicrobiano y el parámetro CPM frente a un patógeno dado, se conoce durante cuánto tiempo las concentraciones plasmáticas experimentales se encuentran por encima de la CPM y se puede determinar el protocolo de dosificación que minimiza la aparición de mutantes resistentes (Blondeau y cols., 2001).

En función del valor de la concentración preventiva de mutantes, CPM, los antimicrobianos se clasifican en dos categorías. A la primera categoría pertenecen los antimicrobianos que administrados en monoterapia a dosis estándar, alcanzan concentraciones superiores a la CPM, y a la segunda pertenecen aquellos quimioterápicos, cuyas concentraciones plasmáticas no alcanzan la CPM, por lo que deben administrarse concomitantemente con otros antibacterianos. Ejemplos del primer grupo serían algunas fluoroquinolonas frente a un elevado porcentaje de gram negativos y gram positivos. Al segundo grupo, pertenecerían agentes como los tuberculostáticos (Epstein y cols., 2004).

2.8. ESPECTRO ANTIBACTERIANO.

Las quinolonas actúan específicamente sobre el ADN por lo que son rápidamente bactericidas y muestran efecto post antibiótico (Vancutsem y cols., 1990; Mckellar, 1996).

Además, actúan como antibióticos concentración dependientes frente a bacterias Gram negativas y como tiempo dependiente o una combinación de ambos efectos frente a Gram positivas (Cester y cols., 1996).

Una de las características de estos antibióticos es que la relación entre la concentración *in vitro* del antimicrobiano y la muerte bacteriana describe una curva de tipo bifásico, con disminución del efecto bactericida a muy altas concentraciones. Esto puede deberse a una inhibición de la síntesis de RNA a muy altas concentraciones de fármaco, síntesis que es necesaria para que haya efecto bactericida (Otero y cols., 2001).

Las fluoroquinolonas incluso a concentraciones por debajo de la CMI (Wetzstein y De Jong, 1996):

1. Inhiben la división celular.
2. Reducen la tasa de crecimiento bacteriano.
3. Inducen cambios en la ultraestructura de la superficie bacteriana que previene la colonización de tejidos específicos.
4. Interfieren en la expresión de factores de virulencia.
5. Aumentan la susceptibilidad de algunos microorganismos a la fagocitosis.

La eficacia de las fluorquinolonas puede verse afectada por el pH del medio. Se ha comprobado menor actividad contra bacterias Gram negativas en medio ácido que en medio básico. Las bacterias Gram positivas parecen no verse afectadas por el pH (McKellar, 1996; Brown, 1996). Wetzstein demostró que a pH ligeramente ácido (tejidos inflamados, abscesos o fagocitos) se reduce la tasa de muerte de algunas bacterias en presencia de enrofloxacin. En contraste, a pH 8 la actividad bactericida del enrofloxacin no varía (Wetzstein y De Jong, 1996).

Las fluoroquinolonas presentan una serie de características microbiológicas (Otero y cols., 2001):

1. Rápida actividad bactericida a concentraciones relativamente bajas.
2. Estrecha relación entre la CMI y la concentración bactericida mínima con menor efecto de inóculo para la mayoría de los organismos.

3. Prolongado efecto post antibiótico sobre estafilococos, enterobacterias y pseudomonas.
4. No seleccionan mutantes resistentes mediados por plásmidos.
5. Frecuencia de resistencia mutacional baja ($<10^{-9}$).
6. No alteran la flora de estreptococos y anaerobios intestinales.
7. Inhiben a las bacterias resistentes a los aminoglucósidos y betalactámicos.

En general, las fluoroquinolonas de amplio espectro cubren una amplia variedad de patógenos, incluyendo microorganismos gram positivos, gram negativos, micoplasmas y pseudomonas. En la tabla 4 se observan de forma simplificada, las características comparativas de siete quinolonas, como ejemplo.

Marbofloxacino es eficaz frente a bacterias gram-positivas (especialmente *Staphylococcus spp.* y *Streptococcus spp.*) y bacterias gram-negativas (especialmente *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, *Proteus spp*, *Klebsiella spp*, *Pasteurella spp*, *Moraxella spp* y *Pseudomonas spp*) (Spreng y cols., 1995).

Numerosos estudios determinan la CMI de las fluoroquinolonas frente a diferentes tipos bacterianos. McKellar y cols. (2004), determinaron los valores de CMI₉₀ para enrofloxacino, orbifloxacino, marbofloxacino y difloxacino frente a *S. aureus*, *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Estos autores exponen que la ratio C_{max}/CMI es particularmente útil en la determinación de su actividad óptima. El impacto de la CMI sobre los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos se demuestra claramente en el caso del orbifloxacino. Además, las fluoroquinolonas mantienen su actividad frente a bacterias gram positivas con valores más bajos de AUC₀₋₂₄/CMI que en bacterias gram negativas, lo que resulta paradójico ya que sus valores de CMI suelen ser más bajos en bacterias gram negativas.

Grobbel y cols. (2007) determinaron los valores de CMI₅₀ para enrofloxacino, ciprofloxacino, danofloxacino, difloxacino, norfloxacino y marbofloxacino frente a *M. haemolytica*, *P. multocida*, *E. coli*, *S. aureus*, *Staphylococci coagulasa negativos*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *A. pleuropneumoniae*, *B. bronchiseptica* y *S. suis*, aisladas de bovino y porcino. Los datos muestran una alta actividad *in vitro* para enrofloxacino y ciprofloxacino contra todos los patógenos bovinos y porcinos testados. Marbofloxacino fue significativamente más activo que

enrofloxacin frente a *M. haemolítica*, *E. coli* y *B. bronchiseptica*, pero menos activo frente a *P. multocida*, *S. aureus*, estafilococos coagulasa negativos, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *A. pleuropneumoniae* y *A. suis*.

Marín y cols. (2010b) determinaron las CMI₅₀ y CMI₉₀ para marbofloxacin, orbifloxacin y danofloxacin en cepas de *S. aureus* aisladas de cabras afectadas por mastitis. De los tres antibacterianos testados, danofloxacin presentó menores valores de CMI, mientras que marbofloxacin presentó valores intermedios y orbifloxacin valores superiores.

Schneider y cols. (2004) estudiaron la sensibilidad de marbofloxacin frente a cepas de *E. coli* aisladas de vacas afectadas de mastitis. Marbofloxacin presentó una CMI₉₀ considerablemente baja, y los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ fueron mejores para marbofloxacin que para enrofloxacin. Para las cepas de *S. aureus*, los valores de CMI₉₀ fueron más altos que para *E. coli*, aunque no hubo ninguna cepa resistente.

	NAL	PIP	NOR	CIP	LEV	MOX
Generación	1 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a	3 ^a	4 ^a
Acción sobre gram positivos	-	-	+	++	+++	+++
Acción sobre gram negativos	++	++	+++	+++	++	++
Acción sobre gérmenes intracelulares	-	-	+	+	+++	+++
Acción sobre anaerobios	-	-	-	-	-	++

NAL: ácido nalidixico; PIP: ácido pipemídico; CIP: ciprofloxacino; NOR: norfloxacino; LEV: levofloxacino; MOX: moxifloxacino.

Tabla 4.- Características comparativas de seis quinolonas (Gobernado y Santos, 2002).

En la tabla 5, se exponen los valores de CMI₅₀, CMI₉₀ y rango de concentraciones (µg/ml) obtenidas con marbofloxacin frente diferentes cepas bacterianas.

Cepas	Especie	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Rango	Referencia
<i>E. coli</i>	Vaca	0,011	0,016	0,008-4	(Schneider y cols., 2004)
	Vaca	0,016		0,008-0,25	(Grobbel y cols., 2007)
<i>S. aureus</i>	Vaca	0,154	0,229	0,06-0,5	(Schneider y cols., 2004)
	Cabra	0,5	1	0,25-2,0	(Marín y cols., 2010b)
	Conejo	0,297	0,494		(Rougier y cols., 2006)
	Perro		0,25		(McKellar y cols., 2004)
	Pony		0,25		(Voermans y cols., 2006)
	Vaca	0,25		0,03-8	(Grobbel y cols., 2007)
<i>M. Haemolytica</i>	Ternero		0,1	0,04-0,178	(Ismail y cols., 2006)
	Vaca	0,03		0,016-0,12	(Grobbel y cols., 2007)
<i>P. multocida</i>	Conejo	0,013	0,079		(Rougier y cols, 2006)
	Conejo	0,016		0,004-0,03	(Abo-El-Sooud y cols, 2009)
<i>B. bronchiseptica</i>	Conejo	0,195	1,320		(Rougier y cols, 2006)
	Cerdo	0,25		0,12-0,5	(Grobbel y cols., 2007)
<i>Pseudomonas spp</i>	Conejo	0,336	1,741		(Rougier y cols, 2006)
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Vaca	1,0		0,5-1,0	(Grobbel y cols., 2007)
<i>Streptococcus uberis</i>	Vaca	1,0		0,5-1,0	(Grobbel y cols., 2007)
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Cerdo	0,016		0,008-0,5	(Grobbel y cols., 2007)
<i>Streptococcus suis</i>	Cerdo	0,5		0,25-2,0	(Grobbel y cols., 2007)
<i>Arcobacter butzleri</i>	Cerdo y vaca	0,5	16	0,0625-64	(Fera y cols., 2003)
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	Cerdo y vaca	0,5	2	0,0625-64	(Fera y cols., 2003)

Tabla 5.- Valores de CMI_{50} , CMI_{90} y rango de concentraciones ($\mu\text{g/ml}$) obtenidas con marbofloxacino.

2.9. RESISTENCIAS

Para ejercer su efecto citotóxico, las quinolonas deben penetrar en el interior de la bacteria, alcanzar su diana celular, las topoisomerasas II y IV, y posteriormente inducir la muerte de la célula. La resistencia a las quinolonas incluye aquellos mecanismos que impiden a estos quimioterápicos alcanzar su diana y/o interactuar con la misma (Hooper, 2002). La inactivación de las fluoroquinolonas ha sido descrita con enrofloxacino frente a los hongos *Phanerochaete chrysosporium* y *Gloeophyllum striatum* (Wetzstein y cols., 1997) y, recientemente, ha sido puesto de manifiesto la N-acetilación del anillo piperazínico de las quinolonas, por parte de una acetiltransferasa que también modifica los aminoglucósidos y que está codificada por una variante del gen *aac(6')/lb*. Esta resistencia se ha considerado transferible y de bajo nivel (Robicsek y cols., 2006).

Además de la inactivación de las quinolonas, anteriormente descrita, los mecanismos que utilizan los microorganismos para eludir la acción bactericida de las quinolonas se basan en las alteraciones que afectan a la diana de las mismas y las modificaciones que disminuyen la concentración de la quinolona en el interior de la bacteria.

2.9.1. ALTERACIONES QUE AFECTAN A LA DIANA DE LAS FLUOROQUINOLONAS.

Mediante mutaciones en los genes que codifican la ADN girasa (*gyrA*, *gyrB*) y la topoisomerasa IV (*parC*, *parE*). Estas alteraciones se consideran el mecanismo principal de resistencia a fluoroquinolonas. Las mutaciones en *gyrA*, el gen que codifica la subunidad A de la ADN girasa, constituyen el mecanismo más común de resistencia a quinolonas en las bacterias gram negativas, mientras que las mutaciones en *parC* (gen que codifica la subunidad C de la topoisomerasa IV) lo son para las gram positivas (Gobernado, 2001). Estas mutaciones involucran áreas similares en el gen, denominadas QRDR (*quinolone resistance-determining regions*), que en el caso de *gyrA* en *E.coli* se localiza entre el aminoácido 67 y el 106. También se han observado mutaciones que afectan a la subunidad B de la ADN girasa (*gyrB*) y a la subunidad E de la topoisomerasa IV (*parE*), sin embargo, estas mutaciones son menos frecuentes y de menor relevancia clínica (Sanders, 2001). La presencia de una única mutación

(mutantes de primer escalón) en la región QRDR de *gyrA*, suele dar lugar a altos niveles de resistencia para el ácido nalidíxico, mientras que son necesarias mutaciones adicionales en *gyrA* y/o en *parC* para obtener estos niveles de resistencia en fluoroquinolonas (Hooper, 2000b; Ruiz, 2003).

2.9.2.-MODIFICACIONES QUE DISMINUYEN LA CONCENTRACIÓN DE LA QUINOLONA EN EL INTERIOR DE LA BACTERIA

Se han observado resistencias por alteración de la membrana externa en bacterias gram negativas y resistencias a causa de la sobreexpresión de bombas de eflujo en bacterias gram positivas y gram negativas

2.9.2.1.- Resistencias por alteración de la membrana externa en bacterias gram negativas

Estas modificaciones se originan por alteraciones de los genes que codifican los canales de las porinas, que ejercen un papel fundamental en la difusión de la quinolona a través de la membrana externa. Cohen y cols. (1989), observaron que varios mutantes, que mostraban resistencia a las quinolonas hidrofílicas, tenían en común la reducción del número de OmpF, la principal y mayor proteína de las porinas de la membrana externa de *E. coli*. Se ha observado que fármacos como cloranfenicol, tetraciclinas y salicilatos pueden inducir la expresión de *MarA* (gen regulador cuyo efecto neto es la disminución de la expresión de OmpF) (Ruiz, 2003). Estas resistencias suelen ser de bajo nivel, necesitándose que el microorganismo disponga además de algún otro mecanismo de resistencia para hacer inviable la acción de la fluoroquinolona (Sanders, 2001).

2.9.2.2.-Resistencia a causa de la sobreexpresión de bombas de eflujo en bacterias gram positivas y gram negativas

Estas bombas expulsan la quinolona desde el medio intracelular al extracelular por acción de transportadores activos endógenos, impidiendo su acumulación (Li y Nikaido, 2004).

La mayor expresión, sobreexpresión, de una bomba de eflujo u otra va a depender del microorganismo y de la quinolona a la que se ve expuesta (Join-Lambert y cols., 2001).

Así se encuentra que:

- Durante los días de tratamiento frente a *Pseudomonas aeruginosa*, ciprofloxacino desarrolla preferentemente, en ratas, la sobreexpresión de MexEF-OprN, mientras que trovafloxacino desarrolla MexCD-OprJ (Join-Lambert y cols., 2001).
- Los sistemas/bombas de eflujo son diferentes para gram positivos y gram negativos, en estos últimos los sistemas de eflujo son multicomponentes. La tabla 6 recoge, para importantes patógenos en clínica, las bombas de eflujo causantes de resistencia a fluoroquinolonas. Nótese como para una misma bomba en muchos casos el espectro incluye varios quimioterápicos, por lo que, en el caso de que un patógeno sobreexpresa alguno de estos sistemas, se pueden establecer resistencias cruzadas entre antibacterianos (Li y Nikaido, 2004; Aeschlimann, 2003; Join-Lambert y cols., 2001; Poole, 2000).
- La expresión de los transportadores de expulsión puede determinar el grado de sensibilidad antimicrobiana, y está reconocida como causa de resistencia de bajo grado a quinolonas (Hooper, 2002; Taléns-Visconti y cols., 2002).

Como ya se ha mencionado anteriormente, las quinolonas son antibacterianos sintéticos (moléculas sin contacto previo con microorganismos) y que además, actúan sobre enzimas con funciones esenciales para la bacteria, estas razones provocan que el desarrollo de mutantes resistentes no sea rápido. Ante la exposición a la fluoroquinolona, la supervivencia de las bacterias se ve comprometida y se desarrollan mecanismos de resistencia que disminuyen la concentración del fármaco en el interior celular, como la sobreexpresión de bombas de eflujo, aunque este hecho suponga un coste extra para la bacteria. Estas ventajas *a priori* de las quinolonas, tienen la contrapartida de seleccionar la sobreexpresión de estos sistemas, que en muchas ocasiones confieren a los microorganismos resistencias multifármaco (Poole, 2000; Li y Nikaido, 2004), si bien, ya se conocen y se realizan estudios con inhibidores de estas bombas, como reserpina y otras moléculas más potentes como 5'-metoxihidnocarpina, fenilalanilarginil- β -naftilamida o la M-clorofenil-hidrazona (Pidcock y Jin, 1999; Schmitz y cols., 2000; Li y Nikaido, 2004). A este respecto, Beyer y cols. (2000), estudian la emergencia de resistentes utilizando reserpina, como inhibidor de los sistemas de eflujo de fluoroquinolonas en *S. aureus* y *S.pneumoniae*.

Los mecanismos de resistencia pueden manifestarse solos o en combinación. La resistencia se manifiesta por un aumento de la CMI de las quinolonas para bacterias

determinadas, y generalmente, ocurre en distintos escalones. Las cepas mutantes de primer escalón aparecen por mutación de una de las dos topoisomerasas, dando como resultado un grado moderado de resistencia. Una nueva mutación da lugar a los mutantes de segundo escalón, que conlleva a una resistencia más elevada con CMI's aún superiores (Sanders, 2001).

Microorganismo		Componentes de la bomba de eflujo			Sustratos del sistema de eflujo
GRAM NEGATIVOS	<i>Acinetobacter baumannii</i>	AdeA	AdeB	AdeC	Fluoroquinolonas, Aminoglucósidos, Novobiocina, Trimetoprim, Cloramfenicol, Tetraciclinas
	<i>Campylobacter jejuni</i>	CmeA	CmeB	CmeC	Fluoroquinolonas, Acido Nalidíxico, Ampicilina, Eritromicina, Cloramfenicol
	<i>Escherichia coli</i>	AcrA	AcrB	TolC	Fluoroquinolonas, Cloramfenicol, Novobiocina, Rifampicina, Betalactámicos, Macrólidos
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MexA	MexB	OprM	Fluoroquinolonas, Aminoglucósidos, Cloramfenicol, Novobiocina, Tetraciclinas, Trimetoprim, Betalactámicos, Macrólidos, Sulfonamidas
		MexC	MexD	OprJ	Fluoroquinolonas, Cloramfenicol, Cefalosporinas, Tetraciclinas
		MexE	MexF	OprN	Fluoroquinolonas, Cloramfenicol
		MexX	MexY	OprM	Fluoroquinolonas, Aminoglucósidos, Eritromicina, Tetraciclinas, Cefalosporinas
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	SmeA	SmeB	SmeC	Fluoroquinolonas, Aminoglucósidos, Betalactámicos
		SmeD	SmeE	SmeF	Fluoroquinolonas, Tetraciclinas, Eritromicina

	<i>Salmonella typhimurium</i>	AcrA	AcrB	ToIC	Fluoroquinolonas, Betalactámicos
GRAM POSITIVOS	<i>Bacillus subtilis</i>	Blt			Fluoroquinolonas
		Bmr			Fluoroquinolonas
	<i>Enterococcus faecalis</i>	EmeA			Fluoroquinolonas, Clindamicina, Eritromicina, Novobiocina
	<i>Staphylococcus aureus</i>	NorA			Fluoroquinolonas (quinolonas fundamentalmente hidrófilas como enoxacino y norfloxacino)
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	PmrA			Fluoroquinolonas

Tabla 6- Componentes y sustratos de las bombas de eflujo en bacterias gram (+) y gram (-).

Las resistencias a quinolonas son de tipo cromosómico generalmente, aunque se han registrado casos de resistencia mediada por plásmidos. Concreta y cronológicamente:

- *In vitro*, se ha observado la capacidad de *S. pneumoniae* y de estreptococos del grupo viridans de incorporar vía transformación, fragmentos de *gyrA* y *parC*, que incluyen las regiones QRDR. Estos estudios, además, muestran que la resistencia podría ser transferida del ADN de *S. pneumoniae* a estreptococos del grupo viridans y a la inversa (Ferrándiz y cols., 2000).
- Tran y Jacoby (2002), demuestran la existencia del gen *qnr* en plásmidos, y que la proteína que codifica protege a la ADN girasa de la inhibición causada por las quinolonas, si bien, Jacoby y cols. (2003), describen la baja prevalencia de este gen, ya que sólo lo encontraron en seis cepas (cinco de *K. pneumoniae* y una de *E. coli*) de entre un elevado número de series procedentes de 19 países.
- En la Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy en San Francisco 2006, se recogen distintos trabajos en los que se comunica la resistencia a fluoroquinolonas mediada por los genes transmitidos por plásmidos de la familia *qnr*. Se describen los genes *qnrA* (con las variantes del A1 al A7), los genes *qnrB* (con las variantes

del B1 al B6) y los genes *qnrS1* y *qnrS2*, cada uno de ellos con distinta prevalencia según las diferentes regiones geográficas. Estos genes:

1. Confieren resistencia frente al ácido nalidíxico, frente a las fluoroquinolonas la confieren de bajo nivel, pero facilitan la aparición de un mayor nivel de resistencia debida a mutaciones adicionales en los genes cromosómicos.

2. Están presentes en una gran variedad de especies de enterobacterias (*Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter sakazakii* y *Enterobacter spp.*) tanto de adquisición comunitaria como nosocomial.

3. Se asocian en general con betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y con alguna mutación además en *gyrA* o *parC*.

- Además, se ha descrito una nueva bomba de eflujo plasmídica denominada Qep, causante de resistencia transmisible a fluoroquinolonas, en un aislado de *Escherichia coli* procedente de Japón (Resumen científico ICAAC, 2006).

El continuo incremento en la prevalencia de aislados resistentes a quinolonas, se puede atribuir a su uso extensivo y abusivo, tanto en medicina humana como en veterinaria (Ruiz, 2003). En 1997, Blanco y cols., publican el porcentaje de resistencias a quinolonas que registraron en 301 aislados clínicos de *E. coli* pertenecientes a pollos infectados y 167 aislados controles de *E. coli* obtenidos en Orense. En el estudio se pone de manifiesto una resistencia de nivel medio-alto (36-46%) para el ácido pipemídico y nalidíxico y una resistencia moderada (13-24%) para norfloxacino, ofloxacino, ciprofloxacino, flumequina y pefloxacino. A raíz de los resultados y a consecuencia del riesgo de resistencia cruzada con patógenos entéricos humanos (concretamente, *Salmonella spp* y *Campylobacter spp*), los autores recomiendan un uso prudente de fluoroquinolonas en aves de corral.

En medicina humana, la prevalencia de la resistencia de *Streptococcus pneumoniae* a fluoroquinolonas en España es baja, aunque varía con el tiempo, la región geográfica, la edad y el origen de las cepas (De la Campa y cols., 2004). La incidencia total de *Streptococcus pneumoniae* resistente a ciprofloxacino registrada en los últimos años oscila entre 2,6 y 7% (Pérez-Trallero et al., 2001; De la Campa y cols., 2004). Por otro lado, se ha observado que las fluoroquinolonas más modernas se ven menos afectadas por las resistencias y seleccionan menos mutantes resistentes, este hecho, podría deberse a su gran afinidad por las

topoisomerasas, y por tanto, a su gran poder letal, por ello se ha recomendado restringir el uso de las quinolonas más antiguas (Beyer y cols., 2000; Pestova y cols., 2000; Sanders, 2001; Li y Nikaido, 2004). Así, mientras que una cepa de *S. pneumoniae* mutante de primer escalón es resistente a ofloxacino, puede seguir siendo sensible a moxifloxacino, aunque la sensibilidad para éste último disminuye (Gobernado, 2001).

El problema aparece cuando la resistencia tiene impacto en la clínica, es decir, cuando los tratamientos empíricos dejan de ser eficaces. Los fracasos del tratamiento además de repercutir en el paciente, también impactan en el Sistema de Salud en conjunto, prolongando la enfermedad y llevando a incrementos en los costos de la salud (Talan, 2001).

2.9.3. SENSIBILIDAD A MARBOFLOXACINO. PUNTOS DE CORTE.

Rougier y cols. (2006) analizaron la susceptibilidad de diferentes antibacterianos frente a cepas aisladas de infecciones del tracto respiratorio superior de conejos. Entre otros, se estudió la susceptibilidad de marbofloxacino frente a *B. bronchiseptica*, *P. multocida*, *Pseudomonas spp* y *S. aureus*. Un 88,9% de las cepas de *B. bronchiseptica* fueron susceptibles, un 5% resistentes y 6,1% presentaron una susceptibilidad intermedia. En el mismo estudio, el 100% de cepas de *P. multocida* fueron susceptibles a marbofloxacino. Respecto a *Pseudomonas ssp* un 87,8% de cepas fueron susceptibles, un 7,3% resistentes y un 4,9% presentaron susceptibilidad intermedia. Por último, un 96,3% de cepas de *Staphylococcus spp* fueron susceptibles y un 3,7% resistentes.

La determinación de la CMI se realizó usando el método de microdilución recomendado por CLSI (2009). Se fijaron como puntos de corte los siguientes valores (CLSI 2008) que se recogen en la tabla 7:

		CMI estándar (µg/mL)		
		Resistente	Sensibilidad intermedia	Sensible
Microorganismo	<i>Staphylococcus spp.</i>	≥ 4	2	≤ 1

Tabla 7.- Puntos de corte establecidos para marbofloxacino.

Schneider y cols. (2004) determinaron la susceptibilidad de marbofloxacino frente a cepas de *E. coli* y *S. aureus* procedentes de mamitis de vacas. De las cepas de *E. coli* el 98,6% fueron susceptibles y el 1,4% resistente, sin embargo, todas las cepas de *S. aureus* fueron susceptibles.

De microorganismos aislados en perros y gatos, el 100% de las cepas de *Pasteurella multocida* y de *Staphylococcus aureus* fueron sensibles a marbofloxacino, así como un 83% de *Pseudomonas aeruginosa* y un 90% de *E. coli* (Vetoquinol, 2001).

2.10.- PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS

2.10.1.-ABSORCIÓN Y BIODISPONIBILIDAD

Aunque hay importantes variaciones individuales entre quinolonas en las diferentes especies de animales, en general, son rápidamente absorbidas tras su administración oral en monogástricos, mientras que en rumiantes, las concentraciones sistémicas alcanzadas tras la administración por esta vía están por debajo de los niveles terapéuticos. Por ejemplo, la biodisponibilidad oral de enrofloxacino en rumiantes adultos alcanza solo el 10%, mientras que en no rumiantes es mayor del 80% (Greene y Budsberg, 1993; Vancutsem y cols., 1990).

En general, a menos que las administremos con alimentos que contengan alta cantidad de cationes divalentes, la administración oral postprandial de fluoroquinolonas no va a sufrir una disminución clínicamente importante en su biodisponibilidad. Sin embargo, debido a la naturaleza lipofílica de las quinolonas, los alimentos pueden incrementar su biodisponibilidad oral y, por tanto, aumentar las concentraciones sistémicas. Por ejemplo, si administramos ibafloxacino junto con alimentos, se produce un incremento del AUC y C_{max} en gatos (Coulet y cols., 2005).

Al igual que otras quinolonas, marbofloxacino ofrece valores muy aceptables para estas variables, siendo los tiempos de absorción reducidos en las especies estudiadas y las biodisponibilidades elevadas. Las vías de administración intramuscular, subcutánea y oral presentan tiempos de absorción y biodisponibilidad del fármaco equiparables (a excepción de la vía oral en rumiantes). En las especies estudiadas, marbofloxacino ha demostrado tener un buen grado de penetración tisular alcanzando concentraciones en plasma rápidas y elevadas (Lai y cols., 2009).

En el conejo, Abo-El-Sooud y Goudah (2009) obtuvieron un valor de t_{max} de 0,22 h y una biodisponibilidad de 101,9% tras la aplicación intramuscular de marbofloxacino en animales sanos. Sin embargo, Carpenter y cols., 2009 obtuvieron un tiempo para alcanzar la concentración máxima mucho mayor ($t_{max} = 1,60$ h) tras la administración oral.

En perro y gato se obtuvieron concentraciones séricas máximas a las 1,5 y 2 horas, respectivamente, tras la administración por vía oral. La biodisponibilidad en estas especies fue de un 94% y 100%, respectivamente (Plumb, 2010).

En el caballo, tras la administración intramuscular, la concentración máxima se alcanzó a los 57 minutos con una biodisponibilidad aproximada del 87% (Carretero y cols., 2002). Trás la administración subcutánea la absorción fue rápida y la biodisponibilidad elevada ($F = 98\%$), sin embargo, el valor de biodisponibilidad fue inferior para la administración oral ($F = 62\%$) (Bousquet-melou y cols., 2002).

En la cabra, se obtuvo una biodisponibilidad elevada (100.74 %) tras la administración intramuscular de marbofloxacino y el tiempo en que se alcanzó la concentración máxima fue de 0,9 horas (Waxman y cols, 2001) y ligeramente más prolongado (1,25 h) tras la administración subcutánea (Waxman y cols, 2006).

En vacas y terneros, las concentraciones máximas se obtuvieron rápidamente tras la administración intramuscular obteniéndose biodisponibilidades elevadas ($t_{max} = 45$ minutos y 1 hora, respectivamente; Schneider y cols., 2003; Ismail y El-Kattan, 2007).

En el cerdo, tras la administración intramuscular de marbofloxacino, el tiempo máximo alcanzó un valor de 0,15 h y la biodisponibilidad de 110,2 %. Sin embargo, tras la administración oral, se obtuvieron valores más elevados para el tiempo máximo (1,15 h) y menores para la biodisponibilidad (107,9 %; Ding y cols, 2010). A continuación, se expone una tabla con los valores de tiempo máximo y de biodisponibilidad obtenidos para marbofloxacino en otras especies:

Especie	Vía	t_{max} (h)	F (%)	Referencia
Pavo	VO	6,0	84,37	Haritova y cols., 2006
Tortuga	IM	0,65	104,4	Lai y cols., 2009; Marín y cols., 2009
	VO	15		

Guacamayo	VO	2,6	90	Carpenter y cols., 2006
Búfalo	IM	0,5	86,79	Goudah y cols, 2007
Pitón	VO	9		Coke y cols, 2006
Avestruz	IM	0,61	95,03	de Lucas y cols., 2004

Tabla 8.- Valores de t_{max} y biodisponibilidad de marbofloxacino en otras especies.

2.10.2.- DISTRIBUCIÓN TISULAR Y CONJUGACIÓN PROTEICA

La actividad *in vivo* de un agente antimicrobiano, debido a la capacidad del fármaco para pasar de la sangre a los tejidos, depende de la fracción libre de dicho fármaco. Por tanto, cuando usamos las características farmacocinéticas y farmacodinámicas para evaluar una dosis apropiada de una quinolona, es más interesante conocer la fracción libre de fármaco que la concentración total de éste (Bergogne-Berezin, 2002; Drusano, 2002). A este respecto, es importante reseñar que las CMI's calculadas *in vitro* son determinadas en base a la concentración de fármaco libre. Desafortunadamente, en la bibliografía veterinaria se le da muy poca importancia a este factor, y la mayoría de estudios farmacocinéticos expresan sus parámetros (p.e.: AUC, C_{max}) para concentración total de fármaco.

La existencia de barreras puede dificultar la difusión de un antibacteriano al sitio de infección, provocando diferencias entre la concentración plasmática de fármaco y las concentraciones a las que están expuestos los microorganismos. Ejemplos de estas barreras son los abscesos, la barrera hemato-encefálica y la pared bacteriana (Costerton y cols, 1999; Toutain y cols., 2002). Por esta razón, comprender la respuesta de un agente infeccioso, nos facilitará desarrollar y usar los ratios farmacocinéticos/farmacodinámicos para calcular la dosis óptima. De forma similar, la comprensión de las características de unión de un antibacteriano y su capacidad para difundirse en tejidos a través de las barreras biológicas, ayudará a los clínicos a definir una apropiada pauta terapéutica.

Las fluoroquinolonas poseen, en general, amplios volúmenes de distribución, mayores de 1.0 L/kg (Aminimanizani y cols., 2001; Lode y cols., 1998). Cuando consideramos estos valores es importante conocer que los volúmenes de los fluidos corporales compartimentalizados son alrededor de 0.05 L/kg para plasma, 0.2 L/kg para fluidos extracelulares y 0.7 L/kg para el agua corporal total (Wamberg y cols., 2002). Volúmenes superiores a 0.7 L/kg indican que el

fármaco está unido preferentemente a tejidos, pudiendo o no estar disponible para su función, y pudiendo haber sido secuestrado en el interior de las células. No obstante, cuando consideramos la concentración de antibacteriano intersticial libre, se ha confirmado que esta concentración es comparable a la concentración del fármaco libre en plasma (Araki et al., 1997). Por tanto, excluyendo las situaciones asociadas a la captación iónica, alcanzado el equilibrio de concentraciones (libre) entre sangre y tejidos (Muller y cols., 1999), las concentraciones de fármaco libre en tejidos pueden preverse en base a la concentración de fármaco libre en plasma, incluso en casos en que la unión a proteínas no es lineal (Kovar y cols., 1997).

En general, marbofloxacino difunde rápidamente a los espacios extravasculares. Como otras fluoroquinolonas, tiene un volumen de distribución elevado en las especies estudiadas y logra una buena penetración en los tejidos y fluidos corporales.

En la siguiente tabla se presentan los resultados obtenidos para el volumen de distribución aparente en el compartimento central (V_c) y el obtenido en estado estacionario (V_{ss}) para diferentes especies animales:

Para el conejo, en el estudio de Abo-El-Sooud y Goudah (2009), con dosis de 2 mg/kg, se obtuvo un valor del volumen de distribución en estado estacionario de 1,65 L/kg. Comparando estos valores con aquéllos obtenidos en conejos infectados con *Pasterella multocida*, no se encontraron diferencias significativas.

En perro y gato, el porcentaje de unión a proteínas fue reducido y el volumen de distribución V_{ss} alcanzó valores de 1,2 a 1,9 L/kg, respectivamente, a dosis de 2 mg/kg. Las concentraciones de marbofloxacino en piel, músculo, hígado, riñón, pulmón, vejiga urinaria y tracto digestivo fueron mayores que en plasma en ambas especies (Plumb, 2010).

En cabras, el volumen de distribución en estado estacionario mostró diferencias entre animales jóvenes (0,92 L/kg a la semana de edad, 1,0 l/kg a las seis semanas) y adultos (1,31 L/kg), de forma que los valores más altos se dieron en cabras adultas. Se concluye que sus valores se incrementan con la edad (Waxman y cols., 2004). La causa de estas diferencias pueden deberse a que la proporción agua/grasa orgánica es mayor en animales jóvenes, por lo que fármacos liposolubles, como las quinolonas, distribuirán mejor en animales adultos. No se hallaron diferencias significativas respecto al volumen de distribución en el compartimento central (V_c), (Waxman y cols., 2004).

Especie	V_c (l/kg)	V_{ss} (l/kg)	Referencia
Conejo		1,65	Abo-El-Sooud y Goudah, 2009
Ternera	0,42	1,1	Ismail y El-Kattan, 2006
Cabra	0,74	1,31	Waxman y cols., 2001
Caballo	0,36	1,17	Carretero y cols., 2002
Cerdo	0,87	1,3	Ding y cols., 2010
Pavo		1,41	Haritova y cols, 2006
Tortuga		0.35	Lai y cols., 2009
Guacamayo		1,3	Carpenter y cols., 2006
Buitre	0,98	1,51	García-Montijano y cols, 2010
Búfalo		1,77	Goudah y cols., 2007
Avestruz		3,22	de Lucas y cols., 2004

Tabla 9.- Valores obtenidos de V_c y V_{ss} para diferentes especies animales.

Los resultados obtenidos muestran una correcta distribución de marbofloxacino a tejidos periféricos y una adecuada absorción tras la administración oral e intramuscular. Como ejemplo, en el cerdo, las concentraciones medias plasmáticas tras 24 horas de la administración oral o intramuscular a la dosis de 2,5 mg/kg fueron mayores a 0,25 µg/mL, resultado superior o muy cercano a la CMI₉₀ contra la mayoría de las bacterias patógenas. Por todo ello, Ding y cols (2010) y para esta especie, manifiestan que marbofloxacino parece una opción terapéutica muy aceptable ante los infecciones de piel y tejidos blandos. Sin embargo, estos resultados difieren en la tortuga (*Caretta Caretta*), ya que en esta especie, el volumen de distribución aparente fue reducido, por lo que se sospecha un grado alto de unión a proteínas plasmáticas o un grado bajo de acumulación en ciertos órganos (Lai y cols., 2009).

2.10.3.- ACLARAMIENTO PLASMÁTICO Y ELIMINACIÓN

Las fluoroquinolonas, pueden ser clasificadas según su principal mecanismo de eliminación (Karablut y Drusano, 1993):

1. Vía renal: orbifloxacino, ofloxacino, temafloxacino y lomefloxacino.
2. Vía hepática: difloxacino y perfloxacino.
3. Por ambas vías renal y hepática: enrofloxacino, marbofloxacino, danofloxacino, norfloxacino y ciprofloxacino.

El metabolismo hepático que sufren las fluoroquinolonas varía en las distintas especies animales y para las distintas quinolonas, lo que se traduce en un amplio rango de semividas (Greene y Budsberg, 1993; Vancutsem et y cols., 1990). Las biotransformaciones de estos fármacos incluyen la glucuroconjugación (moxifloxacino, grepafloxacino, cinafloxacino y esparfloxacino), la N-oxidación y la desmetilación (levofloxacino), y se llevan a cabo principalmente por el sistema del citocromo P₄₅₀ (Bergogne-Berezin, 2002). Para marbofloxacino se supone que la metabolización hepática es mínima (10-15% de la dosis administrada). La eliminación es un 40% en la orina y el resto vía biliar por las heces (Carpenter y cols., 2006).

Como se dijo anteriormente, las quinolonas pueden verse afectadas por la secreción activa a través de la membrana intestinal. Además, las concentraciones intestinales de estos antibacterianos también pueden variar en función de la secreción biliar y del establecimiento del ciclo enterohepático, que puede incrementar el tiempo de residencia de estos fármacos en el organismo. Por ejemplo, en perros Beagles, el 80% de una dosis intravenosa de difloxacino es eliminada en heces debido a la secreción biliar. Aproximadamente el 72-80% del fármaco en bilis es un éster glucurónido y solamente el 6-9% está sin biotransformar. La forma glucurónida es hidrolizada en intestino, dando lugar a la forma original, que es reabsorbida. Como consecuencia de esto, la semivida del difloxacino en perros tras la administración oral es de 9,4 horas.

La extensión de la eliminación renal de las fluoroquinolonas varía entre ellas. Levofloxacino y gatifloxacino se eliminan principalmente por el riñón, con un aclaramiento renal de levofloxacino mayor que el aclaramiento de la creatinina, aproximadamente un 60%, lo que sugiere la existencia de filtración glomerular y secreción tubular (Okazaki y cols., 1991).

En general, marbofloxacino tiene un tiempo de eliminación prolongado en todas las especies estudiadas menos en rumiantes y en aves de presa (de Lucas y cols., 2004).

Los valores de aclaramiento (Cl) de marbofloxacino en las diferentes especies estudiadas son, en general, relativamente bajos (tabla 10). Así, como ejemplo, tenemos valores de 0,2 L/h/kg en el conejo (Carpenter y cols., 2009) y 0,23 L/h/kg en la cabra (Waxman y cols,

2001). En la avestruz, de Lucas y cols., (2004), obtienen valores muy elevados para el aclaramiento (2,19 L/h/kg) lo que concuerda con la semivida más corta registrada en esta especie.

Especie	Cl (L/h/kg)	Referencia
Conejo	0,2	Abo-El-Sooud y Goudah, 2009
Tenera	0,18	Ismail y El-Kattan, 2006
Cabra	0,23	Waxman y cols., 2001
Caballo	0,19	Carretero y cols., 2002
Pavo	0,16	Haritova y cols., 2006
Cerdo	0,12	Ding y cols., 2010
Tortuga	0,016	Lai y cols., 2009
Guacamayo	0,29	Carpenter y cols, 2006
Buitre	0,11	García-Montijano y cols., 2010
Avestruz	2,19	de Lucas y cols., 2004

Tabla 10.- Valores de Cl en diferentes especies animales

2.10.4.- DIFERENCIAS ENTRE ESPECIES DE LAS FLUOROQUINOLONAS

Existen diferencias farmacocinéticas importantes entre especies en las distintas fluoroquinolonas. Cox y cols. (2004) analizaron las relaciones alométricas para el Cl y V_{ss} en diferentes especies de mamíferos (vacuno, cerdo, oveja, perro, rata, mono, cabra, búfalo y hombre) para ciprofloxacino y describieron las siguientes relaciones estimadas:

$$Cl = 20.6 (mL/min) \times BW^{0.815}, r = 0.95, \quad V_{ss} = 3.5 (L) \times BW^{0.947}, r = 0.93.$$

En el mismo estudio, Cox y sus compañeros examinaron también las relaciones alométricas para enrofloxacin. El gráfico resultante de la representación de log BW frente log Cl o log V_{ss} mostró una importante dispersión. Sin embargo, aunque exista un valor alto de r, puede no ser muy precisa la extrapolación a especies desconocidas con las relaciones alométricas para el Cl y el V_{ss} . Particularmente, pueden ocurrir grandes errores de extrapolación cuando intentamos predecir parámetros farmacocinéticos en grandes especies como el caballo y o la

vaca, siendo necesario incluir animales de elevado peso en el análisis de regresión para compensar dichos errores (Mahmood, 2007). También hay numerosos casos en que ecuaciones con bajos valores de r predicen extrapolaciones de forma muy precisa para especies animales desconocidas (Mahmood, 2001).

En otro estudio, Cox (2007) analizó las relaciones alométricas para moxifloxacino, danofloxacino, difloxacino y marbofloxacino, obteniendo, para este último, en vacuno, cerdo, oveja, perro, cabra, caballo y gato las siguientes relaciones estimadas:

$$Cl = 1.96 \text{ (mL/min)} \times BW^{1.13}, r = 0.96, \quad V_{ss} = 1.34 \text{ (L)} \times BW^{1.01}, r = 0.99.$$

Estas relaciones indican que el aclaramiento y el volumen de distribución en estado estacionario se correlacionan muy bien con el peso corporal ($r \geq 0,96$), y que puede asumirse proporcionalidad entre dichos parámetros farmacocinéticos con el peso corporal.

En la tabla 11 se muestran diferentes valores de semividas en la fase terminal ($t_{1/2z}$) y biodisponibilidad (F), para diferentes fluoroquinolonas (AliAbadi y Lees, 2002, Carretero y cols., 2002, Fernández-Varón et al., 2006a, Greene y Budsberg, 1993, Mann y Frame, 1992)

	Enrofloxacinó		Danofloxacinó		Marbofloxacinó	
	F_{PO} (%)	$t_{1/2}$ (h)	F_{IM} (%)	$t_{1/2}$ (h)	F_{IM} (%)	$t_{1/2}$ (h)
Pollo	101	15.6				
Pavo	61	3.9				
Ternero	8	15.4	78	2.9	103	4.7
Cerdo			76	6.8		
Oveja			95.7	3.35		
Caballo	60	5.6	88.5	5.36	88	4.7
Cabra					100	7.2

Tabla 11.- Valores de semividas ($t_{1/2z}$) y biodisponibilidad (F), para diferentes fluoroquinolonas

2.10.5.- DIFERENCIAS ENTRE ESPECIES DE MARBOFLOXACINO

La farmacocinética de marbofloxacino se ha estudiado en distintas especies (tabla 12). Entre ellas caballo (Bousquet-Melou y cols., 2002 a-b; Carretero y cols., 2002; Voermans y cols., 2006; Gardner y cols., 2004), búfalo (Goudah y cols., 2007), cerdo (Ding y cols., 2010), vaca (Schneider y cols, 2004), cabra (Waxman y cols., 2001, 2004, 2006 y 2007; Sidhu y cols., 2006 y 2010), guacamayo (Carpenter y cols, 2006), pavo (Haritova y cols., 2006), burro (González y cols, 2007), pitón (Coke y cols., 2006), ternero (Sidhu y cols., 2005; Ismail y El-Kattan, 2006), buitres (García-Montijano y cols., 2001-2010), avestruz (de Lucas y cols., 2004), foca común (KuKanich y cols., 2007) y tortuga (Lai y cols., 2009; Marin y cols., 2009). Además, en conejo se ha realizado un estudio acerca de la influencia de la infección por *Pasteurella multocida* en el comportamiento farmacocinético de marbofloxacino demostrando características farmacocinéticas adecuadas en conejos enfermos (Abo-El-Sooud y Goudah, 2009). También se ha publicado un estudio sobre la farmacocinética basal en conejos a dosis de 5 mg/kg (Carpenter y cols., 2009).

Especie	Vía	$t_{1/2\lambda z}$ (h)	V_c (L/kg)	V_{ss} (L/kg)	Cl (L/h/kg)	AUC_{∞} (mg·h/L)	MRT (h)	C_{max} (mg/L)	t_{max} (h)	F %
Conejo	IV	5,78		1,65	0,2	12,21	8,41			
	IM	4,33				12,44	6,81	1,81	1,03	101,9
	VO	8,00				10,50	9,2	1,73	1,6	
Ternera	IV	4,6	0,42	1,1	0,18	12	6,1			
	IM	4,7				12,31	7,4	1,4	1,0	103
Cabra	IV	7,18	0,74	1,31	0,23	8,44	5,06			
	IM					8,87	5,44	1,87	0,9	100,74
	SC	5,74				8,15	4,80	1,77	1,25	
Caballo	IV	4,74	0,36	1,17	0,19	11,27	6,35			
	IM	5,47				9,88	6,91	1,42	0,95	87,94
	SC	10,41				7,94	8,66	1,07	0,72	97,6
	VO	8,78				5,11	8,97	0,89	0,58	62,4
Cerdo	IV	7,94	0,87	1,3	0,12					
	IM	17,3						1,81	0,71	110,2
	VO	23,14						1,03	3,83	107,9

Pavo	IV	7,37		1,41	0,16	12,94	9,04			
	VO	7,73				10,89	14,01	0,67	6,0	84,37
Tortuga	IV	14,96		0,35	0,016	118,6	21,55			
	IM	19,03				133,2	28,2	8,9	0,65	104,4
	VO	13,33				348,2	22,59	11,7	15	
Guacamayo	IV	4,3		1,3	0,29	9,41	5,0			
	VO	3,9				7,94	6,7	1,08	2,6	90
Buitre	IV	12,51	0,97	1,51	0,11	19,46	13,54			
Búfalo	IV	7,52		1,77	0,18					
	IM							2,0	0,5	86,79
Avestruz	IV	1,47		3,22	2,19	2,32	1,46			
	IM	1,96				2,25	2,11	1,13	0,61	95,03
Perro	IV	10,8		1,33	0,09	22,4	14,1			
Gato	IV	7,98	0,51	1,01	0,09	23,53	11,19			

Tabla 12.- Parámetros farmacocinéticos de marbofloxacino obtenidos en diferentes especies animales.

2.10.6.- PENETRACIÓN EN LECHE.

La mastitis es un problema muy importante en la producción lechera caprina, ovina y bovina, no solo por las pérdidas económicas que provoca a los productores, sino también por la seguridad e higiene de los alimentos producidos para consumo humano.

Generalmente las fluoroquinolonas se distribuyen ampliamente en la ubre, aunque su disposición depende de la especie animal. En caprino, los regímenes de dosificación son normalmente extrapolados de parámetros farmacocinéticos de ovino y bovino, pudiendo dar lugar a dosis inapropiadas que conducen a niveles terapéuticos no efectivos, y por tanto, al riesgo de desarrollo de resistencias. Igualmente, si extrapolamos dosis demasiado elevadas, pueden aparecer efectos tóxicos. Por ello, resulta necesario investigar la disposición de las fluoroquinolonas en caprino, así como su eliminación en leche, para evaluar su potencial uso en esta especie. Hay que tener en cuenta, cuando se realizan estudios farmacocinéticos de eliminación en leche de un fármaco en animales sanos, que la mastitis provoca una serie de cambios físicos y químicos en la leche y en la glándula mamaria, que pueden alterar la

distribución del antibiótico en dicho compartimento. La inflamación de la glándula mamaria va a conducir a cambios de la permeabilidad vascular y diferencias en la composición de la leche. El pH generalmente aumenta, la concentración de caseína desciende, la concentración de albúmina y células somáticas se incrementa, y los niveles de grasa pueden descender (todo ello genera alteraciones farmacocinéticas que no son debidamente consideradas). Todos estos factores tienen un impacto sobre la farmacocinética del fármaco, sin embargo, su importancia no es bien comprendida aún (Gehring y Smith, 2006). Por ejemplo, Fang y Pyörälä (1996) mostraron que la actividad de enrofloxacin en leche no mastítica contra cepas de *Escherichia coli*, se reducía a la mitad, mientras mantenía similar actividad en leche mamítica.

Para nuestro conocimiento, y en la fecha de publicación de esta tesis doctoral, no existen publicaciones sobre el índice de penetración de Marbofloxacin en leche de cabra.

2.11 – INTERACCIONES

Las siguientes interacciones medicamentosas han sido documentadas o son teóricamente posibles en las personas o en los animales que reciben marbofloxacin u otras fluoroquinolonas:

- Antiácidos y productos lácteos que contienen cationes divalentes o trivalentes como Mg^{2+} , Al^{3+} y Ca^{2+} pueden formar quelatos con marbofloxacin e impedir su absorción debiendo separarse su administración oral al menos 2 horas. En el caso de moxifloxacin, se ha estudiado el efecto de los productos lácteos sobre su farmacocinética. Para ello se administraron dos dosis únicas de este antibacteriano con yogur y sin él. La presencia de yogur aumentó el valor de $t_{máx}$ y redujo en un 15% el de $C_{máx}$, sin modificar el valor del AUC. Por lo que no se consideró necesario realizar ningún cambio en la dosis de moxifloxacin para compensar el efecto de los productos lácteos (Wise, 1999).

- Algunos antibióticos como amonoglucósidos, cefalosporinas de tercera generación y penicilinas de amplio espectro, pueden producir sinergismo contra algunas bacterias (en particular, *Pseudomonas aeruginosa*), pero no es predecible. Aunque marbofloxacin tiene mínima actividad contra microorganismos anaerobios, se ha informado del desarrollo de sinergismo *in vitro* cuando se asocia con clindamicina contra cepas de *Peptostreptococcus*, *Lactobacillus* y *Bacteroides fragilis* (Plumb, 2010).

- Ciclosporina. Las fluoroquinolonas pueden exacerbar la nefrotoxicidad y reducir el metabolismo de la ciclosporina (usadas vía sistémica) (Plumb, 2010)
- Flunixin. En los perros se ha demostrado un aumento del AUC y la semivida de eliminación de enrofloxacin, y éste último a su vez aumenta el AUC y la semivida de la flunixin, se desconoce si existen interferencias con otros AINEs (Plumb, 2010).
- Gliburida. Es posible la presentación de hipoglucemias graves (Plumb, 2010).
- Hierro, Zinc (vía oral). Disminuyen la absorción por la formación de quelatos, se debe separar la administración de ambos 2 horas (Plumb, 2010).
- Metotrexato. Es posible un aumento de sus niveles con la correspondiente toxicidad (Plumb, 2010).
- Fenitoína. Sus niveles se pueden alterar (Plumb, 2010).
- Cimetidina y probenecid. Los fármacos anti-H₂ no interfieren en la absorción, pero el uso concomitante de cimetidina o probenecid inhibe la secreción tubular de las fluoroquinolonas (Gobernado y Santos, 2002; Stockley, 2004). Se bloquea la secreción tubular y aumentan los niveles en sangre y la semivida de marbofloxacin. El probenecid se segrega en los túbulos renales mediante un mecanismo activo y posee una alta afinidad por el transportador de aniones; de este modo, compete y puede bloquear la excreción de muchos ácidos orgánicos. El valor del aclaramiento renal de ciprofloxacino disminuye alrededor del 50% cuando se administra 1 g de probenecid vía oral antes de un comprimido de ciprofloxacino (500 mg), aunque no se modifican los valores de AUC o de t_{1/2}. Este efecto también se ha observado con enoxacin, norfloxacino y fleroxacin, y es posible que también ocurra con otras fluoroquinolonas cuya excreción se produzca principalmente por orina mediante secreción tubular activa. (Gobernado y Santos, 2002; Stockley, 2004).
- Sucralfato. Inhibe la absorción. Separar al menos 2 horas su administración (Plumb, 2010).
- Teofilina y cafeína. Marbofloxacin puede aumentar los niveles en sangre de estas sustancias (Plumb, 2010; Gobernado y Santos, 2002). La interacción descrita entre algunas quinolonas y estos fármacos, se debe a la inhibición ejercida por estos antimicrobianos sobre el sistema enzimático del citocromo P₄₅₀ encargado de su metabolismo. La acción está influenciada por la naturaleza de los radicales en posición 7 y en

posición 1 de la quinolona (si bien, la influencia es menor por R₁), siendo los más comprometidos los grupos piperacínicos (ciprofloxacino y norfloxacino) y pirrolidínicos (tosufloxacino y clinafloxacino) en posición 7, y disminuyendo cuando el grupo ciclopropil en la posición 1 se sustituye por otros grupos, como el fluorofenil, o se hacen modificaciones en C₇ (Gobernado y Santos, 2002; Stockley, 2004; Gutiérrez-Zufiaurre, 2004). Esta interacción, determina la aparición de los efectos tóxicos típicos de teofilina y cafeína con manifestaciones sobre el SNC, incluyendo convulsiones. El ácido pipemídico y la enoxacina son las quinolonas que provocan un mayor incremento en las concentraciones de teofilina, alcanzando incluso el 40%; ciprofloxacino provoca un aumento de alrededor del 5%; y norfloxacino, ofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino y gatifloxacino apenas modifican las concentraciones plasmáticas de este fármaco (Gobernado y Santos, 2002).

- Warfarina. Aumento de los efectos de la warfarina (Plumb, 2010).
- No se ha observado interacción entre marbofloxacino y agentes anestésicos como isoflurano y medetomidina/ketamina en el perro y el gato, aunque debido a la falta de estudios específicos, no puede excluirse esta posibilidad (ficha técnica Marbocyl).

2.12 TOXICIDAD Y EFECTOS ADVERSOS

En general, las quinolonas son antibacterianos bien tolerados, aunque con algunas excepciones. El tanto por ciento medio de reacciones adversas a las quinolonas es bajo, aunque oscila mucho entre cada par quinolona-efecto adverso (Gobernado et al., 1999). Las quinolonas fluoradas comparten algunas características, entre ellas, el perfil de efectos adversos. La similitud en estas características tiene su origen en la presencia de partes comunes en su estructura química (Azanza et al., 2000; Mandell et al., 2001). Los problemas relacionados con estos quimioterápicos, pueden observarse en el aparato digestivo, la piel, el riñón, el sistema musculoesquelético, el sistema cardiovascular y el sistema nervioso central (SNC), manifestándose por náuseas, vómitos, diarreas, dolor abdominal, anorexia, elevación de las transaminasas, ictericia colostática, hepatitis, eritema, prurito, fotosensibilidad, cristaluria, hematuria, elevación de las cifras de urea, artropatías, tendinitis, taquicardia, alargamiento del intervalo QTc en el electrocardiograma, insomnio, cefaleas, temblores y convulsiones. Algunas quinolonas, no obstante, son capaces de causar efectos graves o con tasas superiores a otros antibacterianos usados como alternativas, lo que ha supuesto su eliminación del arsenal

terapéutico: fleroxacino por fototoxicidad y toxicidad sobre el SNC, trovafloxacino por alteraciones hepáticas graves, grepafloxacino por alteraciones en el ritmo cardíaco (espacio QTc del electrocardiograma), temafloxacino por causar anemia hemolítica grave, además de clinafloxacino el cual se asoció a fototoxicidad e hipoglucemia (Ball, 2000; Fish, 2001; Rubinstein., 2001; Emmerson y Jones, 2003). Por tanto, y teniendo en cuenta la estructura química, y el farmacóforo mostrado para las quinolonas en general, y las fluoroquinolonas en particular (figura 7), podemos describir la relación entre la estructura química y el perfil de efectos adversos (Azanza y cols., 2000; Ball, 2000; Mandell y cols., 2001):

Tipo de reacción adversa	Intensidad
R₁ Interacción con xantinas	Ciclopropil>CH ₃ CH ₂ >difluorofenil>FC ₂ H ₅
R₅ Fotosensibilidad y Genotoxicidad	CH ₃ >>H>NH ₂ y CH ₃ >NH ₂ >H
R₇ Neurotoxicidad Interacción con AINE Interacción con xantinas	Piperazinil> ciclopropil>>otros Piperazinil>> ciclopropil>>otros Ciclopropil>> piperazinil>>otros
X₈ Determinante mayor de Fototoxicidad y de Genotoxicidad	CF > CCl> N> CH> COMe, CCF CF > CCl≥ COMe >N> CH

Tabla 13.- Relación entre la estructura química y el perfil de efectos adversos en las quinolonas.

2.12.1. REACCIONES ADEVSERSAS GASTROINTESTINALES

Las alteraciones gastrointestinales son comunes a todas las quinolonas, la mayoría de las veces leves y reversibles, y son las que se presentan con mayor frecuencia. El malestar gastrointestinal parece estar causado por una combinación entre irritación gástrica directa e influencia sobre el SNC, sin que se haya demostrado una asociación entre estos efectos adversos y estructuras químicas específicas (Mandell, 2001). Se producen en un 5-13% de los enfermos, manifestándose como náuseas, vómitos, anorexia, dispepsia, alteración del gusto, dolor abdominal y diarrea (Gobernado y Santos, 2002).

También han sido descritos casos de diarrea asociada a *Clostridium difficile* (DACD) a consecuencia de la administración de fluoroquinolonas como ciprofloxacino, gatifloxacino o levofloxacino (McCusker y cols., 2003; Gaynes y cols., 2004).

2.12.2. REACCIONES ADVERSAS SOBRE SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Los efectos sobre el sistema nervioso central, son los más comunes después de los gastrointestinales, con una incidencia que oscila entre el 0,9% y el 7,4%. Se manifiestan por cefalea, mareos leves, convulsiones, fatiga, insomnio, confusión y agitación (Cohen y cols., 2001).

Las convulsiones son muy infrecuentes y generalmente ocurren en pacientes con factores predisponentes a padecerlas, pero a su vez son de gran interés. Su aparición podría ser consecuencia de que las quinolonas a concentraciones hísticas elevadas, se unen al receptor del ácido gamma-aminobutírico (GABA), un inhibidor de la transmisión del potencial de acción en la sinapsis de la célula nerviosa cerebral de los mamíferos, desplazándolo y dando lugar a estimulación del SNC. También podría deberse a la activación de los receptores de aminoácidos estimulantes y modificación en los receptores de adenosina. Esta estimulación se relaciona directamente con la estructura de la quinolona. Las sustituciones en la posición 7 de la molécula parecen tener más influencia en este tipo de efectos. Las moléculas con el grupo piperacina tienen mayor unión a los receptores GABA, mientras que los grupos de mayor peso molecular presentan menor unión (Kawakami J y cols., 1997; Fish, 2001). Por otro lado, también puede contribuir la sustitución en la posición 4 (Gobernado y Santos, 2002). Además del receptor del GABA, el receptor N-metil-D-aspartato podría ser un punto de unión de las quinolonas con el SNC (Fish, 2001).

Estos efectos adversos pueden potenciarse por las interferencias con otros fármacos sobre el mismo receptor o por interacción medicamentosa general (Azanza y cols., 2000).

2.12.3. REACCIONES ALÉRGICAS

Al igual que cualquier otro antibacteriano, las quinolonas fluoradas pueden producir reacciones alérgicas, aunque su incidencia no supera el 2% con ninguno de los fármacos de este grupo. Los cuadros clínicos más frecuentes son prurito, eritema y urticaria. De forma excepcional (incidencia < 2/100.000), se han descrito reacciones anafilácticas y anafilactoides. Los antecedentes alérgicos a uno de los fármacos de este grupo contraindican, en principio, la utilización del resto de esta familia (Azanza y cols., 2000).

2.12.4. REACCIONES DE FOTOSENSIBILIDAD

La exposición a la luz solar en el curso del tratamiento con algunas quinolonas fluoradas puede producir una reacción de fotosensibilidad. El término fotosensibilidad comprende tanto las reacciones fotoalérgicas como las fototóxicas (Fish, 2001).

Las reacciones fotoalérgicas son raras y requieren la exposición previa de la fluoroquinolona, además, son dependientes de la presencia de sustituyentes fotohapténicos (Fish, 2001).

En contraste, las reacciones fototóxicas son más frecuentes, y se presentan en forma de eritema o de erupción bullosa grave (Fish, 2001).

La fototoxicidad depende de la descomposición de la fluoroquinolona y del O₂ y, por tanto, de los radicales libres formados bajo la acción de los rayos UVA. Está relacionada con los sustituyentes de la posición C₅ de la molécula, siendo el grupo metil el más perjudicial, y en la posición C₈, siendo los halógenos los peores en este segundo caso. Un grupo metoxi, en lugar de un halógeno en dicha posición ha demostrado menor toxicidad (Fish, 2001; Mandell y cols., 2001).

2.12.5. REACCIONES ADVERSAS MUSCULOESQUELÉTICAS

Las reacciones adversas musculoesqueléticas hacen referencia a las artropatías y a la tendinitis.

Todas las fluoroquinolonas pueden producir alteraciones del cartílago articular en animales jóvenes cuando se administran a dosis elevadas, por lo que se sospecha que puede tratarse de un efecto adverso propio del grupo farmacológico. La incidencia no supera el 1% con ninguno de los fármacos (Mandell y cols., 2001), sin embargo, su uso está restringido en la población pediátrica (Chalumeau y cols., 2003).

La administración intraarticular de quinolonas produce necrosis de los condrocitos y erosiones con formación de cavidades. Se sospecha que el mecanismo es una disfunción mitocondrial generada por la inhibición de la síntesis de ADN y de la actividad del glucosaminoglicano en el cartílago articular inmaduro (Fish, 2001).

La artritis producida por quinolonas se presenta con mayor frecuencia en pacientes menores de 30 años. Sus características clínicas son la presencia de inflamación y dolor articular

que afecta a una o varias articulaciones y que se presenta coincidiendo con el inicio del tratamiento. Excepcionalmente, se ha descrito evolución a la cronicidad, ya que el curso habitual es hacia la resolución completa en algunas semanas (Fish, 2001).

Además de las artropatías, estos antibacterianos se han implicado en la etiología de tendinitis y ruptura de tendones de mano, hombros y principalmente del tendón de Aquiles, siendo la afectación tanto bilateral como unilateral. Los enfermos de más riesgo son los sometidos a tratamientos largos, uso concomitante de esteroides y los atletas, aunque con incidencia baja, 0,3%. Las modificaciones estructurales moleculares de las fórmulas de estos fármacos no mejoran este efecto secundario, que es común, en mayor o menor grado, a todas las quinolonas, considerándose un cuadro clínico propio de esta familia de fármacos (Azanza y cols., 2000).

2.12.6. REACCIONES ADVERSAS OCULARES

Se han descrito reacciones adversas oculares en animales de experimentación, cuando se administran en altas dosis pefloxacino y ácido nalidíxico. Los cuadros clínicos más frecuentes son: cataratas, punteados opacos en el cristalino, cambios morfológicos de la retina, y alteración de la agudeza visual (Fish, 2001).

2.12.7. REACCIONES ADVERSAS EN EL APARATO URINARIO

En cuanto al aparato urinario, se ha visto elevación de los niveles de creatinina entre el 0,2 y el 1,0% de los enfermos tratados con quinolonas. Excepcionalmente, se ha descrito algún caso de cristaluria, relacionada con el grado de solubilidad de la quinolona y el pH urinario, y fallo renal, por acción directa o por reacción de hipersensibilidad en adultos mayores de 60 años (Mandell y cols., 2001). Efectos no descritos con las nuevas fluoroquinolonas (Fish, 2001).

2.12.8. REACCIONES ADVERSAS CARDIACAS

Tanto después de la administración i.v. como p.o. de fluoroquinolonas, se ha observado prolongación del intervalo QTc, especialmente con esparfloxacino y grepafloxacino (Fish, 2001).

Los efectos de las fluoroquinolonas en el tejido miocárdico están relacionados aparentemente con el gen HERG, que codifica el canal de potasio Ikr. La inhibición de HERG/Ikr

por las fluoroquinolonas puede inducir la prolongación del intervalo QTc, y como consecuencia, podría provocar arritmias ventriculares o taquicardia ventricular conocida como *torsade de pointes* (Fish, 2001).

Esparfloxacino produjo una prolongación del QTc de 500 milisegundos en el 1,2-3% de los pacientes tratados. Además se describieron siete pacientes con arritmias cardíacas que se relacionaron con el tratamiento. Aparentemente, los cambios se relacionaron directamente con la dosis administrada. La relación de grepafloxacino con algunos casos de prolongación del QTc, fue la causa de su retirada (Azanza y cols., 2000).

2.12.9. REACCIONES ADVERSAS HEMATOLÓGICAS.

El uso de fluoroquinolonas ha sido asociado a anomalías hematológicas como anemia, metahemoglobinemia, leucopenia, granulocitopenia, aumentos y disminuciones en el tiempo de protrombina e incremento y disminución en la concentración de plaquetas, si bien, la incidencia ha sido baja (0,3-1%), y no se ha descrito la causalidad. Con excepción de temafloxacino, es raro que se asocie anemia hemolítica con el uso de estos antibacterianos (Fish, 2001).

2.12.10. CARCINOGENICIDAD Y TERATOGENICIDAD

Está descrito que las quinolonas pueden inhibir a la topoisomerasa II de los mamíferos, homóloga de la ADN girasa de las bacterias, produciendo toxicidad celular y clastogenicidad (roturas en la cadena de ADN) a concentraciones muy elevadas. No obstante, no se ha descubierto en el ser humano ningún efecto carcinogénico, probablemente porque la enzima humana es estructuralmente y funcionalmente distinta: sólo tiene 2 subunidades, en vez de 4, posee distinto peso molecular, 172 kDa, y carece de actividad sobre el enrollamiento del ADN; por consiguiente, estas supuestas alteraciones no deberían manifestarse en el ser humano, y de producirse, ocurrirían a concentraciones de quinolona muy altas (Gobernado y Santos, 2002).

En cuanto a los efectos teratogénicos, ha sido descrito pérdida de peso fetal y un aumento de la mortalidad fetal con levofloxacino en ratones, al administrar dosis muy elevadas (80 veces la dosis humana máxima). Gatifloxacino produjo malformaciones en el esqueleto y un

aumento en la mortalidad neonatal y perinatal cuando se administró en ratas a dosis equivalentes o superiores a la dosis máxima en humanos.

2.12.11. REACCIONES ADVERSAS HEPÁTICAS

Todas las fluoroquinolonas se han relacionado con alteraciones de la función hepática. El cuadro más frecuente consiste en una elevación de la cifra de transaminasas, que cursa de forma asintomática y que se ha descrito globalmente con una incidencia en torno al 2-3%. En la práctica totalidad de los casos, se trata de un hallazgo casual que desaparece con rapidez al suspender la administración del fármaco.

2.12.12. REACCIONES ADVERSAS DESCRITAS CON MARBOFLOXACINO

Marbofloxacinó está contraindicado específicamente en perros de razas pequeñas a medianas hasta los 8 meses de edad, en razas grandes hasta los 12 meses y en razas gigantes hasta los 18 meses. De la misma manera, está contraindicado en gatos menores de 12 meses. La razón es la posibilidad de anomalías en el cartílago de animales jóvenes.

Puede causar estimulación del sistema nervioso central, debiendo usarse con precaución en animales con procesos convulsivos.

Con la excepción de las anomalías en cartílagos de animales jóvenes, el perfil de efectos adversos de marbofloxacinó se limita, la mayoría de las veces, a la disfunción gastrointestinal (vómitos, anorexia, deposiciones blandas, hipersalivación) y a la actividad reducida.

Otras quinolonas han causado raramente elevación de enzimas hepáticas, ataxia, convulsiones, depresión, letargo y nerviosismo en los perros. En el caso de marbofloxacinó también en muy raras ocasiones se ha producido midriasis, temblores musculares y reacciones en el punto de inyección. Puede aparecer también cristaluria en orina (ficha técnica Marbocyl).

No se sabe si puede ocasionar ceguera como enrofloxacinó a altas dosis en gatos. Aunque es poco probable, la base de datos de la FDA acerca de reacciones adversas ha recibido informes de ceguera relacionada con la administración de marbofloxacinó, aunque no se pudo probar el efecto causal (Plumb, 2010).

2.13.- APLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LAS FLUOROQUINOLONAS

Las fluoroquinolonas de uso veterinario autorizadas en la UE son las que se muestran en la tabla 14 en la que se señalan las especies receptoras para las que se indican (AEMPS, 2012; EMA, 2012).

EN RUMIANTES MENORES:

Las fluoroquinolonas son activas, en el caso del ganado ovino y caprino, frente a microorganismos asociados a infecciones respiratorias agudas causadas por *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* y *Haemophilus somnus*. No obstante, también pueden tener otras indicaciones entre las que caben destacar mastitis, metritis, conjuntivitis, e infecciones causadas por *Mycoplasma* spp., como la neumonía y la otitis media entre otras.

FLUOROQUINOLONA	ESPECIES ANIMALES
Flumequina	Gallinas, pavos, cerdos, corderos, cabritos, terneros, salmón y trucha
Enrofloxacin	Perros, gatos, conejos, pollos, pavos, terneros, caballos y cerdos.
Orbifloxacin	Perros y gatos.
Ibafloxacin	Perros y gatos.
Difloxacin	Perros, pollos, pavos y terneros.
Danofloxacin	Bóvidos (carne y leche) y cerdos.
Marbofloxacin	Perros, gatos, cerdos y bovino (carne y leche).
Pradofloxacin	Perros, gatos.

Tabla 14.- Quinolonas utilizadas en medicina veterinaria En vacuno, ovino y caprino

EN CERDO:

Las fluoroquinolonas son activas en el tratamiento de infecciones causadas por *Mycoplasma hyopneumoniae*, y se podrían utilizar en la prevención y tratamiento de infecciones por patógenos tales como *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

EN CABALLOS:

A causa de los efectos adversos que las fluoroquinolonas pueden ejercer sobre las articulaciones como la erosión del cartílago, su uso no está recomendado en potros menores de 3 años. Si bien, la posibilidad de administrar estos quimioterápicos vía oral, convierte a este grupo, en antibacterianos de primera elección en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias gram negativas en caballos. Enrofloxacin se ha utilizado en la pleuritis crónica causada por *E.coli* con éxito clínico. En estos animales, también ha sido descrita la seguridad y eficacia de orbifloxacin (Walker, 2000; USP Drug information, 2003).

EN PERROS Y GATOS:

En este grupo de animales, las fluoroquinolonas pueden ser utilizadas en infecciones del tracto urinario (como prostatitis) e infecciones respiratorias del tracto superior tales como rinitis y del tracto respiratorio inferior como neumonías, incluyendo las causadas por *Bordetella bronchiseptica*. Además, también son ampliamente utilizadas en pioderma profunda y superficial, en otitis media y externa, en infecciones de heridas, en peritonitis asociadas a metronidazol (en caso de infecciones por microorganismos anaerobios), en osteomielitis causadas por gram negativos aerobios y en infecciones causadas por micoplasmas, como conjuntivitis e infecciones de tejidos blandos. Como en otras especies, estos antimicrobianos no deben emplearse en animales jóvenes, menores de 8 meses y en caso de perros de razas grandes, su uso no está recomendado hasta los 12 meses de edad (Walker, 2000).

En infecciones causadas por micobacterias en gatos se han utilizado enrofloxacin y ciprofloxacino. Así, frente a *Mycobacterium lepraemurium*, micobacteria no tuberculosa, enrofloxacin ha resultado eficaz en las manifestaciones cutáneas causadas por este microorganismo (USP Drug information, 2003).

EN AVES DE CORRAL:

En las explotaciones de aves de corral, se necesitan agentes antimicrobianos con capacidad bactericida rápida frente a los patógenos que frecuentemente se aíslan, entre los que destacan: *E. coli*, que causa graves septicemias y celulitis, *Salmonella* spp., *Haemophilus paragallinarum* y *Pasteurella multocida*. Sarafloxacin y enrofloxacin han sido desarrollados para el uso en aves de corral y las indicaciones aprobadas en Estados Unidos comprenden el tratamiento de las infecciones causadas por *E. coli* en pollos y pavos, aunque en la actualidad, sarafloxacin ya no está autorizado en la Unión Europea. Enrofloxacin, además, también ha

sido aprobado en el tratamiento de las infecciones causadas por *P. multocida* en pavos (Walker, 2000; USP Drug information, 2003).

EN CONEJOS:

En el conejo, el tratamiento con fluoroquinolonas está indicado en distintos procesos infecciosos que afectan a piel y tejido subcutáneo (dermatitis, abscesos y mastitis causadas por patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* spp., *Pasteurella multocida* y *Pasteurella* spp.), tracto respiratorio (neumonía, infecciones en el tracto respiratorio superior y conjuntivitis producidas por *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*), aparato gastrointestinal (diarrea, colibacilosis ocasionadas por agentes como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. y *Pseudomonas* spp.), sistema nervioso central (nistagmus, tortícolis causadas por *Pasteurella multocida*), aparato urogenital (cistitis originada por *Escherichia coli* o *Pseudomonas* spp.) y en procesos infecciosos en los que se aísla *Listeria monocytogenes* o *Pasteurella multocida* y que cursan con somnolencia, anorexia, pirexia y septicemia (Burgmann , 2000).

Si bien, en la USP Drug information, 2003, se recoge que en conejos con pasteurellosis, el enrofloxacinó vía parenteral ha demostrado que puede resolver los signos clínicos en los animales infectados, pero no pudo erradicar al patógeno causante de la infección.

Por otro lado, las fluoroquinolonas son efectivas en el tratamiento de las queratitis oculares en conejo causadas por *S. aureus*, con daño tisular e inflamación por la acción de toxinas secretadas por dicho microorganismo. Dajcs y cols., (2004), concluyen en un estudio realizado en conejos que la eficacia de moxifloxacinó en el tratamiento de queratitis causadas por *S. aureus* es superior a la encontrada con levofloxacinó y ciprofloxacino.

OTROS:

En Estados Unidos aunque la seguridad y la eficacia de enrofloxacinó no ha sido establecida, sí que se han realizado recomendaciones acerca de la dosis, basadas en datos farmacocinéticos, para el tratamiento de infecciones por patógenos susceptibles, en las siguientes especies: avutarda, camello, pato, llama, loro gris africano, pitón, emus y oryx (Lewbart y cols., 1997; USP Drug information, 2003).

2.14. CLASIFICACIÓN ANATOMICA-TERAPEUTICA-QUÍMICA DE MARBOFLOXACINO

Para los productos de uso humano la Organización Mundial de la Salud tiene asignados unos códigos según un sistema de clasificación ATC (de las iniciales en inglés Anatomical Therapeutic Chemical). De igual forma, para los productos de uso veterinario se ha elaborado un sistema de clasificación similar denominado en este caso ATC-*vet* en el que Marbofloxacin posee el código **QJ01MA93** (http://www.whooc.no/atcvet/atcvet_index/?code=QJ01MA93) que lo identifica como principio activo de uso veterinario (Q), antiinfeccioso de uso sistémico (J), antibacteriano para uso sistémico (01), antibacteriano quinolona y quinoxalina (M), fluoroquinolona (A), marbofloxacin (93).

2.15. INDICACIONES CLÍNICAS DE MARBOFLOXACINO. Indicaciones aprobadas por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Ficha técnica

En el momento en el que se presenta el siguiente trabajo, marbofloxacin se encuentra disponible en España en diferentes formatos: solución inyectable, gotas óticas en suspensión y comprimidos fraccionables, para las siguientes especies: perro, gato, bovino y cerdo. En general, su uso está autorizado para el tratamiento de infecciones producidas por bacterias sensibles a marbofloxacin:

Gato: está autorizado su uso para el tratamiento de heridas infectadas y abscesos, tratamiento de infecciones pulmonares por gérmenes sensibles y prevención de infecciones quirúrgicas por *Staphylococcus intermedius*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* en gatos.

Perros: está autorizado para infecciones de la piel (intértrigo, foliculitis, impétigo, forunculosis) causadas por cepas sensibles, infecciones de tejidos blandos causadas por cepas sensibles, infecciones del tracto urinario superior e inferior, asociadas o no a prostatitis o epididimitis e infecciones del tracto respiratorio causadas por cepas sensibles. Las gotas óticas tiene uso autorizado para el tratamiento de otitis externas, de origen bacteriano (por gérmenes sensibles a marbofloxacin) y fúngico (*Malassezia pachydermatis* sensible a clotrimazol).

Bovino: está autorizado para el tratamiento de infecciones respiratorias causados por cepas sensibles de *Pasteurella multocida*, *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* y *Mycoplasma*

bovis, tratamiento de la mastitis aguda causada por cepas de *E. coli* sensibles al marbofloxacino durante el período de lactación.

Cerdos: se utiliza en el tratamiento del síndrome Mastitis-Metritis-Agalaxia causado por cepas bacterianas sensibles a marbofloxacino.

Posología, forma de administración y duración del tratamiento

Perros: la dosis recomendada es de 2 mg/kg/día en una sola administración diaria (intravenosa, subcutánea o vía oral) para el tratamiento de las siguientes patologías:

- Infecciones de la piel y los tejidos blandos: la duración del tratamiento es de 5 días como mínimo. Dependiendo de la evolución clínica, puede prolongarse hasta 40 días.

- Pioderma, superficial y grave, se recomienda una duración inicial del tratamiento de 10 a 20 días respectivamente, con una duración máxima de hasta 40 días que se establecerá en función de la evolución clínica del proceso.

- Infecciones del tracto urinario inferior, la duración del tratamiento es de 10 días como mínimo. En caso de prostatitis o epididimitis asociadas, o en caso de infecciones del tracto urinario superior, el tratamiento puede prolongarse hasta 28 días.

- Infecciones respiratorias la duración del tratamiento es de al menos 7 días.

Gatos: la dosis recomendada es de 2 mg/kg/día en una sola administración diaria (intravenosa, subcutánea o vía oral) para el tratamiento de las siguientes patologías:

- Infecciones de la piel y los tejidos blandos (heridas, abscesos, flemones), la duración del tratamiento es de 3 a 5 días.

- Infecciones respiratorias de vías altas la duración del tratamiento es de 5 días.

Bovinos:

- Infecciones respiratorias la dosis recomendada es 2 mg/kg en una única inyección diaria por vía subcutánea o intramuscular durante 3 a 5 días. Se han realizado estudios para la optimización de la dosis en infecciones respiratorias por el titular de la Autorización de Comercialización, indicando una pauta de dosificación optimizada de 8 mg/kg como inyección única por vía intramuscular.

- Mamitis aguda, la dosis recomendada es 2 mg/kg en una única inyección diaria por vía subcutánea o intramuscular durante 3 días consecutivos.

Cerdos: la dosis recomendada es 2 mg/kg en una inyección única diaria por vía intramuscular, durante 3 a 5 días.

2.16.- CONTRAINDICACIONES

Por razones de seguridad marbofloxacino está contraindicado (Ficha técnica):

Bovino y porcino: no utilizar en animales con hipersensibilidad conocida a fluoroquinolonas. No utilizar en caso de patógenos resistentes a otras fluoroquinolonas (resistencias cruzadas)

Perro y gato: Aunque los estudios han demostrado que la administración de marbofloxacino en perros en crecimiento de tamaño medio, de raza Beagle, a dosis de hasta 6 mg/kg/día durante 13 semanas, no evidenció signos de toxicidad en el cartilago articular, no debe utilizarse este producto en cachorros de razas grandes. No administrar a animales epilépticos ante la ausencia de datos en estos casos. No se recomienda administrar a madres gestantes o lactantes.

2.17.- LÍMITES MÁXIMOS DE RESIDUO Y PERIODO DE SUPRESIÓN

El **summary report** del comité para productos veterinarios de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) establece en el documento: *EMEA/MRL/693/99-FINAL, October 1999* que marbofloxacino se incluya en el Anexo I del Reglamento (CEE) del Consejo nº 2377/90 (actualmente derogado y sustituido por el Reglamento (EC) del Parlamento Europeo y del Consejo nº 470/2009). En dicho documento, considerando que la Ingesta Diaria Admisible (ADI) para el hombre es de 4,5 µg/kg de peso vivo (unos 270 µg/persona) y que el consumidor puede ingerir residuos de este producto procedentes de la carne y de la leche que representen el 85 % de la IDA microbiológica, se concluye que los límites máximos de residuo sean los que se señalan en la tabla 15

Reglamento (EC) del Parlamento Europeo y del Consejo nº 470/2009	
Los límites máximos de residuos en bovino	Los límites máximos de residuos en porcino
<ul style="list-style-type: none"> - 150 µg/kg en músculo - 50 µg/kg en grasa - 150 µg/kg en hígado - 150 µg/kg en riñón - 75 µg/kg en leche 	<ul style="list-style-type: none"> - 150 µg/kg en músculo - 50 µg/kg en piel y grasa - 150 µg/kg en hígado - 150 µg/kg en riñón

Tabla 15.- Límites máximos de residuo de Marbofloxacino en productos alimenticios.

Vemos que los límites máximos permitidos son de igual magnitud en los productos cárnicos (músculo, hígado y riñón) procedentes de vacuno y de cerdo haciendo la salvedad de la tasa permitida en grasa de vacuno que se aplica con igual magnitud al conjunto de grasa y piel en el caso del cerdo. Además, en el caso del vacuno se incluyen los valores para leche.

La consecuencia práctica de estos límites es el establecimiento de los periodos de supresión o tiempos de espera para los productos comerciales que contengan este antibacteriano y que estén autorizados para las especies señaladas. Así, en el bovino, el periodo de supresión de marbofloxacino para el consumo de carne es de 3 días tras la administración intramuscular y 6 días tras la administración subcutánea, mientras que en el caso del cerdo, el periodo de supresión es de 4 días para la carne.

Finalmente, para la leche, el periodo de supresión es de 72 horas tras la administración intramuscular y de 36 horas tras la administración vía subcutánea. Para completar estos datos, un estudio realizado por Shem-Tov y cols. (1997) señala que no se encontraron trazas de marbofloxacino en leche pasadas 24 horas de la administración intravenosa o intramuscular del fármaco a dosis de 2, 2,5 y 4 mg/kg.

2.18.- RELACIÓN DE PRODUCTOS COMERCIALES AUTORIZADOS POR LA AGENCIA ESPAÑOLA DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS SANITARIOS (AEMPS) Y COMERCIALIZADOS (actualizada a 30 de septiembre de 2013).

Número de Registro	Denominación del Medicamento	Titular de la autorización de comercialización	Fecha de Primera Autorización del Medicamento (Fecha de la Situación Administrativa)*
2841 ESP	ACTIMARBO 100 mg/ml SOLUCION INYECTABLE PARA BOVINO Y PORCINO	ECUPHAR NV	03/07/2013
2752 ESP	BOFLOX 100 mg/ml SOLUCION INYECTABLE PARA BOVINO Y PORCINO	INDUSTRIAL VETERINARIA, S.A.	13/03/2013
2607 ESP	FORCYL SWINE 160 mg/ml SOLUCION INYECTABLE PARA PORCINO	VETOQUINOL ESPECIALIDADES VETERINARIAS, S.A.	08/08/2012
2319 ESP	FORCYL 160 mg/ml SOLUCION INYECTABLE PARA BOVINO	VETOQUINOL ESPECIALIDADES VETERINARIAS, S.A.	20/06/2011 (30/01/2012)
1298 ESP	MARBOCYL BOLUS	VETOQUINOL ESPECIALIDADES VETERINARIAS, S.A.	07/10/1999
1762 ESP	MARBOCYL BOVINOS 100 mg/ml SOLUCION INYECTABLE PARA BOVINO	VETOQUINOL ESPECIALIDADES VETERINARIAS, S.A.	16/07/2007
1310 ESP	MARBOCYL F.D.	VETOQUINOL ESPECIALIDADES VETERINARIAS, S.A.	22/02/2000
1640 ESP	MARBOCYL P 20 mg	VETOQUINOL ESPECIALIDADES VETERINARIAS, S.A.	08/07/2005
1639 ESP	MARBOCYL P 5 mg	VETOQUINOL ESPECIALIDADES VETERINARIAS, S.A.	08/07/2005
1641 ESP	MARBOCYL P 80 mg	VETOQUINOL ESPECIALIDADES VETERINARIAS, S.A.	08/07/2005
1221 ESP	MARBOCYL 10%	VETOQUINOL ESPECIALIDADES VETERINARIAS, S.A.	06/10/1998
1262 ESP	MARBOCYL 2% SOLUCION	VETOQUINOL	23/03/1999

	INYECTABLE PARA BOVINO Y PORCINO	ESPECIALIDADES VETERINARIAS, S.A.	
2724 ESP	MARBOFLOXORAL 20 mg COMPRIMIDOS PARA PERROS	FATRO IBERICA, S.L.	13/02/2013
2723 ESP	MARBOFLOXORAL 5 mg COMPRIMIDOS PARA PERROS Y GATOS	FATRO IBERICA, S.L.	13/02/2013
2725 ESP	MARBOFLOXORAL 80 mg COMPRIMIDOS PARA PERROS	FATRO IBERICA, S.L.	13/02/2013
2721 ESP	MARBONOR 100 mg/ml DOSIS UNICA SOLUCION INYECTABLE PARA BOVINO	NORBROOK LABORATORIES LTD.	11/02/2013 (14/02/2013)
2722 ESP	MARBONOR 100 mg/ml SOLUCION INYECTABLE PARA BOVINO Y PORCINO	NORBROOK LABORATORIES LTD.	11/02/2013 (14/02/2013)
2713 ESP	MARBOSOL 100 mg/ml SOLUCION INYECTABLE PARA BOVINO Y PORCINO	CP-PHARMA HANDELSGESELLSC HAFT GmbH	05/02/2013 (03/07/2013)
2712 ESP	MARBOSOL 20 mg/ml SOLUCION INYECTABLE PARA TERNEROS Y LECHONES	CP-PHARMA HANDELSGESELLSC HAFT GmbH	05/02/2013 (03/07/2013)
2670 ESP	MARBOSYVA 100 mg/ml SOLUCION INYECTABLE PARA BOVINO Y PORCINO (CERDAS)	LABORATORIOS SYVA, S.A.U.	14/11/2012
2700 ESP	MARBOTAB 20 mg COMPRIMIDOS PARA PERROS Y GATOS	CP-PHARMA HANDELSGESELLSC HAFT GmbH	25/01/2013 (03/07/2013)
2701 ESP	MARBOTAB 80 mg COMPRIMIDOS PARA PERROS	CP-PHARMA HANDELSGESELLSC HAFT GmbH	25/01/2013 (03/07/2013)
2451 ESP	MARBOVET 100 mg/ml SOLUCION INYECTABLE	FATRO IBERICA, S.L.	02/02/2012
2729 ESP	MARBOVET 20 mg COMPRIMIDOS PARA PERROS	FATRO IBERICA, S.L.	15/02/2013
2450 ESP	MARBOVET 20 mg/ml SOLUCION INYECTABLE	FATRO IBERICA, S.L.	02/02/2012
2728 ESP	MARBOVET 5 mg COMPRIMIDOS PARA PERROS Y GATOS	FATRO IBERICA, S.L.	15/02/2013
2730 ESP	MARBOVET 80 mg COMPRIMIDOS PARA PERROS	FATRO IBERICA, S.L.	15/02/2013
2198 ESP	MARBOX 100 mg/ml SOLUCION INYECTABLE PARA BOVINO Y PORCINO	CEVA SALUD ANIMAL, S.A.	04/10/2010
2709 ESP	MARBOXIDIN 20 mg COMPRIMIDOS MASTICABLES PARA PERROS	LAVET PHARMACEUTICALS	04/02/2013 (07/02/2013)

		LTD	
2708 ESP	MARBOXIDIN 5 mg COMPRIMIDOS MASTICABLES PARA PERROS Y GATOS	LAVET PHARMACEUTICALS LTD	04/02/2013 (07/02/2013)
2710 ESP	MARBOXIDIN 80 mg COMPRIMIDOS MASTICABLES PARA PERROS	LAVET PHARMACEUTICALS LTD	04/02/2013 (07/02/2013)
2355 ESP	MARFLOQUIN 100 mg/ml SOLUCION INYECTABLE PARA BOVINO Y PORCINO (CERDAS)	KRKA, D.D., NOVO MESTO	20/09/2011 (16/03/2012)
2749 ESP	MARFLOQUIN 20 mg COMPRIMIDOS PARA PERROS	KRKA, D.D., NOVO MESTO	08/03/2013 (11/03/2013)
2354 ESP	MARFLOQUIN 20 mg/ml SOLUCION INYECTABLE PARA BOVINO (TERNEROS) Y PORCINO	KRKA, D.D., NOVO MESTO	20/09/2011 (16/03/2012)
2748 ESP	MARFLOQUIN 5 mg COMPRIMIDOS PARA GATOS Y PERROS	KRKA, D.D., NOVO MESTO	08/03/2013 (12/03/2013)
2750 ESP	MARFLOQUIN 80 mg COMPRIMIDOS PARA PERROS	KRKA, D.D., NOVO MESTO	08/03/2013 (11/03/2013)
2720 ESP	ODIMAR 100 mg/ml SOLUCION INYECTABLE GANADO BOVINO Y PORCINO	ANIMALCARE LTD.	08/02/2013 (13/02/2013)
2719 ESP	ODIMAR 20 mg/ml SOLUCION INYECTABLE PARA BOVINO Y PORCINO	ANIMALCARE LTD.	08/02/2013 (13/02/2013)
2745 ESP	SOFTIFLOX 20 mg COMPRIMIDOS MASTICABLES CON SABOR PARA PERROS	NORBROOK LABORATORIES LTD.	26/02/2013 (28/02/2013)
2744 ESP	SOFTIFLOX 5 mg COMPRIMIDOS MASTICABLES CON SABOR PARA GATOS Y PERROS	NORBROOK LABORATORIES LTD.	26/02/2013 (28/02/2013)
2746 ESP	SOFTIFLOX 80 mg COMPRIMIDOS MASTICABLES CON SABOR PARA PERROS	NORBROOK LABORATORIES LTD.	26/02/2013
2388 ESP	UBIFLOX DOSIS UNICA 100 mg/ml SOLUCION INYECTABLE PARA BOVINO	KRKA, D.D., NOVO MESTO	26/10/2011
2387 ESP	UBIFLOX 100 mg/ml SOLUCION INYECTABLE PARA BOVINO Y PORCINO (CERDAS)	KRKA, D.D., NOVO MESTO	26/10/2011
2787 ESP	UBIFLOX 20 mg COMPRIMIDOS PARA PERROS	KRKA, D.D., NOVO MESTO	22/04/2013 (24/04/2013)
2386 ESP	UBIFLOX 20 mg/ml SOLUCION INYECTABLE PARA BOVINO Y PORCINO	KRKA, D.D., NOVO MESTO	26/10/2011

2786 ESP	UBIFLOX 5 mg COMPRIMIDOS PARA GATOS Y PERROS	KRKA, D.D., NOVO MESTO	22/04/2013 (24/04/2013)
2788 ESP	UBIFLOX 80 mg COMPRIMIDOS PARA PERROS	KRKA, D.D., NOVO MESTO	22/04/2013 (24/04/2013)

*) Entre paréntesis la fecha de la autorización administrativa vigente si difiere de la fecha de primera autorización.

3.-MATERIALY MÉTODOS

3.1.- MATERIAL.

Los materiales y productos utilizados para la realización del presente trabajo, se relacionan a continuación:

3.1.1.- MATERIAL FUNGIBLE.

- Agujas hipodérmicas.
- Cánulas intravenosas INSYTE® (22G x 1, 0,8 x 25mm).
- Jeringuillas de 2 mL recubiertas con 75 USP de heparina sódica.
- Tubos de ensayo de varias capacidades.
- Micropipetas de varias capacidades Gilson®.
- Puntas para micropipetas de varias capacidades
- Pipeta repetidora HandyStep®.
- Puntas de desplazamiento directo codificadas de varias capacidades Plastibrand®.
- Matraces aforados de varias capacidades.
- Matraces Erlenmeyer de varias capacidades.
- Placas de Petri de 10 cm de diámetro.
- Placas de poli-estireno de 96 celdillas.
- Vasos de precipitado de varias capacidades.
- Viales con tapón para autoinyector 8 x 40, 1 mL, Wheaton, USA.
- Filtros Millipore® tipo HV 0.45 µm de diámetro de poro.
- Tubos Eppendorf 1,5 y 2 mL.

3.1.2.- PRODUCTOS Y REACTIVOS.

- Agua bidestilada.
- Agar Mueller-Hinton II (Beckton Dickinson).
- Mueller-Hinton II de crecimiento (Beckton Dickinson).

- Fosfato monosódico (Fluka-Sigma-Aldrich, Madrid).
- Fosfato disódico (Fluka-Sigma-Aldrich, Madrid).
- Heparina sódica 5% (Mayne Pharma, España).
- Ácido trifluoroacético (Panreac Química, Barcelona).
- Acetonitrilo HPLC (VWR Prolabo International, EC).
- Agua para HPLC (VWR Prolabo International, EC).
- Metanol para HPLC (VWR Prolabo International, EC).
- Marbofloxacino puro (Vetranal, Fluka-Sigma-Aldrich)
- Marbofloxacino – producto medicinal de uso veterinario (Marbocyl®, Vetoquinol).
- Enrofloxacino puro (Monheim, Alemania)
- Polímero P407 (BASF, Alemania).
- Carboximetilcelulosa (Fluka-Sigma-Aldrich, Madrid).

3.1.3.- APARATAJE.

- Agitador magnético SBS A-06.
- Agitador de tubos Heidolph Reax 2000.
- Balanza de precisión Sartorius BP121S, pesada entre 0.0001 y 120 g.
- Campana de flujo laminar horizontal micro-V (Telstar).
- Centrifuga ALC modelo 4236.
- Congelador Sanyo MDF (- 45 °C).
- Replicador de inóculos Steers (Craft Machine, Inc, Cherter, Pa).
- Sonicador Branson 2200.
- Estufa Selecta.
- Espectrofotómetro de doble haz Spectronic, 2000.
- Frigorífico Electrolux® modelo ER 3818C.
- Neveras portátiles isotérmicas.
- Horno microondas Goldstart, modelo MA-894DD.

- Mechero Bunsen.
- Ordenador personal Pentium IV.
- pHmetro Crison Digit 501.
- Termómetro de mercurio.
- HPLC compuesto de:
 - Bomba cuaternaria modelo LC-10Asvp (Shimadzu).
 - Detector de fluorescencia de modelo RF-10Axl (Shimadzu).
 - Autoinyector modelo SIL-10Advp (Shimadzu), con refrigeración por sistema Peltier.
 - Desgasificador DGU 14A (Shimadzu).
 - Módulo mezclador FCV-10AL-VP (Shimadzu).
 - Horno para columnas CTO-10 ASvp (Shimadzu) con rango de temperaturas 4-80° C.
 - PC con el programa Shimadzu Class-VP Chromatography Data System.
 - Columnas Asentis 100 -5 µm C₁₈, 15 cm x 4,6 mm (Supelco, Bellefonte, USA).
 - Precolumnas con la misma composición que la columna.

3.1.4.- SOFTWARE INFORMÁTICO.

- Programa de Análisis Farmacocinético Winnonlin Professional[®] 5.3.
- Paquete de análisis estadístico y representación gráfica Sigmaplot[®] versión 11.0. Systat Software 2011. San Jose, California. USA.
- Paquete de análisis estadístico STATGRAPHICS CENTURION XVI Manugistics, Inc., Rockville, USA.
- Procesador de textos Microsoft[®] Word 2003 y 2007, y Hoja de cálculo Microsoft[®] Excel 2003 y 2007.

- Programa de dibujo y cálculo de parámetro para moléculas y estructuras químicas. *ACD/CHEMSKETCH*. ACD/Labs products. Version freeware 12.0. 2012. Advanced Chemistry Development. Toronto, Ontario, Canadá.

3.2.- ANIMALES.

Para la realización de esta Tesis se han utilizado 1 lote de 6 cabras de la raza Murciano-Granadina con pesos que oscilan entre 49,6 y 68,4 kg y de 2,5 a 3,5 años de edad procedentes de la granja de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia. Los animales estuvieron estabulados durante el ensayo con alimento y bebida *ad libitum*. Todos los animales se encontraban en buen estado de salud, y no recibieron ningún fármaco durante al menos 15 días antes del inicio de la experiencia. Además, durante el estudio, se controló su estado sanitario para asegurar la ausencia de enfermedades infecciosas y/o parasitarias.

3.3.- MEDICAMENTOS.-

Se han empleado diferentes formulaciones de marbofloxacino, una formulación convencional de uso comercial (Marbocyl®, Vetoquinol) para la administración por vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC) y otra formulación de liberación controlada en forma de gel acuoso preparada por nosotros con dos variantes: una con un 25 % (p/v) de Polaxamer 407 (P407) para su administración subcutánea (SC1) y otra en la que se adiciona como coadyuvante un 2 % de Carboximetilcelulosa al P407 (P407-CMC) también para su administración por vía subcutánea (SC2).

La formulación controlada se ha preparado siguiendo el método de Schmolka (1972) modificado por nosotros, de tal forma que se prepara en forma de una solución acuosa que modifica su estado en función de la temperatura manteniéndose en disolución a bajas temperaturas y gelificando a la temperatura corporal. En el caso de la formulación para la preparación P407, se tomaba una cantidad suficiente que se iba añadiendo lentamente al agua fría (5°C) de refrigerado y se agitaba suavemente hasta la obtención de una solución clara y transparente (entre 6-12 horas). En el caso de la preparación P407-CMC se añadía una cantidad suficiente de carboximetilcelulosa además del Polaxamer 407 al agua fría y se seguía similar proceso. En ambos casos, una vez formada la disolución acuosa fría del excipiente se añadía

marbofloxacino puro hasta alcanzar el 5% (p/v) y se agitaba suavemente hasta su completa disolución. Los productos así preparados se mantenían refrigerados a 5°C en forma de solución acuosa clara y transparente.

3.4.- PROTOCOLO EXPERIMENTAL.

El marbofloxacino utilizado como formulación convencional (Marbocyl®, Vetoquinol), se administró a la dosis de 2 mg/kg por vías IV y SC. El marbofloxacino utilizado como formulación de liberación controlada se administró a la dosis de 6 mg/kg por vía subcutánea, tanto la P407 (SC1) como la P407-CMC (SC2).

El estudio fue de tipo cruzado entre las seis cabras (2x2x2) en 4 fases, con intervalos entre cada fase de 15 días para asegurar la ausencia de interferencias entre cada uno de los estudios. Así, el esquema utilizado para la administración del antibiótico a los animales fue el siguiente:

ADMINISTRACIÓN	IV	SC	SC1	SC2
Cabra	1,2	3,6	4	5
Cabra	5	1,2	3,6	4
Cabra	4	5	1,2	3,6
Cabra	3,6	4	5	1,2

Administración intravenosa:

La formulación convencional de marbofloxacino se administró a cada uno de los animales objetos de estudio en la vena yugular derecha. La dosis administrada fue de 2 mg/kg por peso corporal como dosis única.

Las muestras de sangre se recogieron de la vena yugular izquierda a los siguientes tiempos: 0 (blanco), 0,083, 0,167, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 32, 48 y 72 h desde la administración IV del fármaco. Las muestras de sangre fueron centrifugadas inmediatamente a 1500 g durante 10 minutos para separar el plasma. Una vez separado, éste se

congeló por duplicado a - 45°C, dentro de los treinta minutos siguientes a la extracción, hasta el momento de realizar las determinaciones analíticas.

Administración subcutánea:

La administración subcutánea de la formulación convencional de marbofloxacino y de las dos formulaciones de liberación controlada en solución de P407 al 25% y en solución de P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% se administraron a nivel escapular, a una dosis de 2 mg/kg por peso corporal en caso de la formulación convencional, y de 6 mg/kg por peso corporal en el caso de las formulaciones de liberación controlada, como dosis única.

Las muestras de sangre se recogieron de la vena yugular a los siguientes tiempos: 0 (blanco), 0,083, 0,167, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 32, 48, 72, 96 y 120 h tras las tres administraciones subcutáneas. Las muestras recibieron el mismo tratamiento que con la administración intravenosa, es decir, fueron centrifugadas inmediatamente a 1500 g durante 10 minutos para separar el plasma. Una vez separado, éste se congeló por duplicado a - 45°C, dentro de los treinta minutos siguientes a la extracción, hasta el momento de realizar las determinaciones analíticas.

Se evaluó el daño de la administración SC, en el punto de administración (depilado convenientemente con anterioridad), mediante la observación de signos de dolor por parte del animal, cojera, control de la temperatura dérmica en el punto de la administración, reacciones inflamatorias, formación de induraciones, o cualquier otro tipo de modificación macroscópica.

Las formulaciones de liberación controlada si bien pueden administrarse al mismo nivel de dosis que las formulaciones convencionales, los niveles plasmáticos alcanzados suelen estar por debajo de los obtenidos con las formulaciones convencionales. Estos niveles, aún estando condicionados en el tiempo por las fases de liberación y absorción, pueden encontrarse en las cercanías del límite de cuantificación del método analítico, e incluso del límite de detección, dificultando, en muchos casos, el cálculo y la comparación de parámetros farmacocinéticos. Este problema puede solucionarse empleando dosis superiores, y asumiendo linealidad en el intervalo de dosificación.

En este estudio se han empleado dosis tres veces superiores, de 6 mg/kg, en las formulaciones poliméricas, en comparación con las formulaciones convencionales, de 2 mg/kg,

con lo que se persigue alcanzar niveles plasmáticos comparables en los tres casos en los que se ha realizado la administración subcutánea.

Regogida de muestras de leche de los animales:

Se estudió la eliminación de marbofloxacino en la leche caprina. La toma de muestras de leche fue realizada a los siguientes tiempos: 0 (blanco), 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 32, 48, 72, 96 y 120 h tras la administración del fármaco tanto por vía intravenosa como subcutánea, mediante evacuación completa de ambas ubres.

La producción total de leche recogida fue refrigerada a 4-6 °C antes de almacenar dos alícuotas a - 45 °C hasta su posterior procesamiento.

3.5.- MÉTODO ANALÍTICO.

Las concentraciones de marbofloxacino en plasma fueron determinadas mediante un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) modificado del descrito para moxifloxacino por Siefert et al. (1999) y que en síntesis es como sigue: A 200 µL de plasma o leche, se añaden 5 µL de estándar interno (enrofloxacino 75000 µg/L) y 200 µL de acetonitrilo, que hace que las proteínas precipiten. Posteriormente, las muestras se someten a agitación en un baño de ultrasonidos seguido de centrifugación durante 10 min a 3500 g. Del sobrenadante se extraen 100 µL y se diluyen 4 veces con tampón fosfato sódico 0,067 M (pH 7,5) y se transfiere a los viales del autoinyector del HPLC.

La separación se llevó a cabo utilizando una columna de fase reversa Acentis C₁₈ de 150 x 4,6 mm, 5 µm de diámetro de partícula, con un volumen de inyección de 50 µL. Tanto las muestras dentro del autoinyector (sistema Peltier), como la columna fueron termostatzadas a 5°C. La fase móvil estaba compuesta por acetonitrilo (15%) y ácido trifluoroacético en solución (1 g/L) (85%) en régimen isocrático. La velocidad de flujo de la misma fue de 1,0 mL/min. La detección se realizó a una longitud de onda de excitación de 297 nm y una longitud de onda de emisión de 515 nm. La duración de los cromatogramas fue de once minutos.

3.6.- VALIDACIÓN DEL MÉTODO.

LINEALIDAD

Las curvas de calibrado se prepararon con 10 concentraciones diferentes de marbofloxacino entre 2 y 2000 $\mu\text{g/L}$ en metanol, en plasma y en leche de cabra y adicionando el estándar interno. El coeficiente de correlación (r) obtenido fue $> 0,999$.

Las soluciones estándar de marbofloxacino se prepararon mediante diluciones seriadas en metanol hasta alcanzar concentraciones finales de 2, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 y 2000 $\mu\text{g/L}$. La cantidad de estándar interno añadido fue de 5 μL a una concentración de 75000 $\mu\text{g/L}$. Los controles se prepararon a partir de una mezcla de plasmas y de leches a las que se les añadieron cantidades conocidas de marbofloxacino a partir de diluciones seriadas hasta alcanzar las mismas concentraciones finales que en las soluciones estándar. Las alícuotas de los estándares y los controles se procesaron como se ha descrito anteriormente para las muestras y se inyectaron 50 μL en el sistema cromatográfico.

RECUPERACIÓN

Los porcentajes de recuperación se determinaron comparando las áreas de los picos de los controles con distintas concentraciones de fármaco (concretamente a 50, 250 y 1000 $\mu\text{g/L}$ en el caso del plasma, y 50, 500 y 1000 $\mu\text{g/L}$ en el caso de la leche), con las áreas de los picos de los estándares a las concentraciones correspondientes preparados con tampón fosfato. Cada punto se establece a partir de un promedio de tres determinaciones. Los porcentajes de recuperación de marbofloxacino, tanto en plasma como en leche, se muestran a continuación:

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/L}$)	RECUPERACIÓN (%) MARBOFLOXACINO	
	PLASMA	LECHE
50	92,5066	95,4856
250	90,8100	98,4301
1000	90,0339	98,0012

PRECISIÓN

La precisión del ensayo se evaluó expresando en coeficiente de variación o desviación estándar relativa (RDS) como un porcentaje del valor medio. La precisión intra-día se estimó mediante el análisis, en el mismo día, de tres muestras (de plasma y leche) repetidas de tres concentraciones estándar (50, 500 y 1000 $\mu\text{g/L}$) usadas para las curvas de calibrado, obteniéndose valores de RSD: en plasma, < 3%, y en leche < 4%. La precisión inter-día se estimó mediante el análisis de tres concentraciones estándar (50, 500 y 1000 $\mu\text{g/L}$) durante tres días consecutivos. Los resultados de precisión expresados como RSD fueron menores del 6% tanto en plasma como en leche.

Límite de cuantificación y detección

El límite de detección de marbofloxacino en plasma y leche se ha establecido para la concentración más baja que se ha podido detectar diferenciándola del ruido de fondo del aparato. El límite de cuantificación se ha establecido para el nivel de concentración más bajo utilizado en las curvas de calibrado y para el que el RSD es menor al 20%. El límite de detección en plasma y leche fue de 1,45 $\mu\text{g/L}$. En cuanto al límite de cuantificación, en plasma y leche fue de 2 $\mu\text{g/L}$.

3.7.- ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO.

3.7.1.- ANÁLISIS COMPARTIMENTAL. PLASMA.

Una vez obtenidas las concentraciones de marbofloxacino en plasma a los diferentes tiempos de extracción tras la administración de la formulación convencional por las vías IV y SC así como de las dos formulaciones de liberación controlada administradas por vía subcutánea (SC1 y SC2), éstas se han ajustado a ecuaciones poliexponenciales con ponderación igual a los inversos de los cuadrados de la concentración ($W=1/C_p^2$). Los ajustes de los datos a las ecuaciones poliexponenciales se han realizado mediante el programa WinNonlin Professional[®] (versión 5.3). Para la elección del modelo compartimental más adecuado se ha seguido el Criterio de Información de Akaike (Yamaoka y cols., 1978), escogiendo aquél modelo que presenta un valor más bajo del AIC. Su expresión es la siguiente:

$$AIC = N \cdot \ln \sum_{i=1}^N (W_i \cdot (C_i' - C_i)^2) + 2p$$

Donde N es el número de puntos experimentales y p el número de parámetros del modelo en cuestión. La expresión $\sum_{i=1}^N (W_i \cdot (C_i' - C_i)^2)$ corresponde a la suma de cuadrados residuales, donde C_i es la concentración obtenida experimentalmente, C_i' es la concentración teórica obtenida a partir de la ecuación correspondiente a ese modelo, hallada utilizando el método de los mínimos cuadrados y W_i es el factor de ponderación. Para un mismo nivel de ponderación, el modelo con el valor mínimo de AIC se considera el óptimo.

3.7.2.- ANÁLISIS NO COMPARTIMENTAL. PLASMA.

Los parámetros no compartimentales se calcularon de acuerdo con la teoría de los momentos estadísticos (Riegelman y Collier, 1980; Gibaldi y Perrier, 1982), utilizando el programa informático WinNonlin Professional[®] (versión 5.3).

La biodisponibilidad se ha calculado relacionando las áreas totales bajo las curvas de concentración plasmática obtenidas por el método trapezoidal, tras las administraciones extravasculares (subcutáneas) e intravenosas. Este parámetro queda indicado como F o F(%).

3.7.3.- ANÁLISIS DE DATOS. LECHE.

Los datos de concentración en leche obtenidos a los diferentes tiempos fueron analizados mediante un método no compartimental, usando el programa informático WinNonlin Professional[®] (versión 5.3). Se calcularon los siguientes parámetros no compartimentales: $C_{\text{máx}}$, $T_{\text{máx}}$, AUC, $t_{1/2\lambda_z}$, MRT, además de los ratios $AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{plasma}}$ y $C_{\text{máx-leche}}/C_{\text{máx-plasma}}$.

Para todos los parámetros calculados, se tuvieron en cuenta los volúmenes totales de ordeño a cada tiempo.

3.7.4.- ESTIMACIÓN DE LA ABSORCIÓN *IN VIVO* MEDIANTE DECONVOLUCIÓN.

Para evaluar la cantidad de fármaco absorbido en función de la dosis y la formulación empleada, se ha utilizado la técnica de deconvolución numérica incluida en el software

WinNonlin Professional® (versión 5.3). Las pendientes y ordenadas obtenidas de las ecuaciones polioxponenciales tras la administración intravenosa de marbofloxacino, y las curvas plasmáticas obtenidas tras las administraciones extravasculares, han sido utilizadas para construir la función impulso-respuesta que permite descomponer las curvas extravasculares para obtener la cantidad de fármaco absorbida en función del tiempo. A partir de estos datos puede estimarse la velocidad media de absorción, la constante de absorción y la fracción de fármaco absorbido en función de la dosis administrada (Toutain & Bousquet-Mélou, 2004a).

3.8.- MÉTODOS ESTADÍSTICOS.

Para la descripción de los diferentes valores y datos obtenidos, se calcularon los parámetros de centralización y dispersión: media, desviación estándar y coeficiente de variación.

Para comprobar la homogeneidad de los datos, se ha realizado un análisis de la varianza no paramétrico (test de Kruskal-Wallis) en el que se han establecido como hipótesis nulas, que las concentraciones de marbofloxacino no varían entre animales, y que no varían entre tiempos. Se debe de aceptar la primera hipótesis nula (igualdad entre animales) y rechazar la segunda (no igualdad entre tiempos). De esta forma, si se demuestra la no existencia de diferencias significativas entre los animales, la única fuente de variación es el tiempo, por lo que se manifiesta homogeneidad a un tiempo determinado en las concentraciones.

Cuando se detectan la existencia de diferencias significativas entre animales para las parejas de datos o los parámetros farmacocinéticos, se realiza un segundo análisis no paramétrico utilizando el test de Wilcoxon.

Todos los análisis estadísticos se han realizado utilizando el software estadístico STATGRAPHICS CENTURION XVI.

3.9.- ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS: CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS Y PREVENTIVAS DE MUTANTES (CMI Y CPM). VENTANA DE SELECCIÓN DE MUTANTES: ÍNDICE DE PREVENCIÓN DE MUTANTES.

3.9.1 CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS.

Los estudios microbiológicos se ha llevado a cabo con doce cepas de *Staphylococcus aureus*, cedidas por la empresa Exopol S.L. y aisladas de leche de cabra con infecciones

intramamarias en España. Las concentraciones mínimas inhibitorias se determinaron mediante el método de la microdilución en placas de microtitulación (National Committee for Clinical Laboratory Standards; NCCLS, 2002 Y 2006). Tras incubar a +37°C durante una noche, el inóculo fue suspendido en una solución salina (NaCl) al 0,9% hasta obtener una turbidez estándar de 0,5 según la escala de McFarland que equivale, aproximadamente, a un rango de entre cien y doscientos millones de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro ($1-2 \times 10^8$ CFU/mL). Posteriormente estas suspensiones se diluyeron con medio de cultivo hasta una concentración aproximada de 5×10^6 CFU/mL unos 15 minutos antes de su análisis. Las placas con volúmenes de celda de 100 μ L contenían diluciones de marbofloxacino comprendidas entre 0,03 y 128 μ g/mL en caldo Mueller-Hinton y fueron inoculadas con 10 μ l de las diferentes cepas (se alcanzó una concentración final aproximada de 5×10^5 CFU/mL). Las placas se incubaron a +37°C en estufa y se observaron a las 24 horas. Se procedió a su lectura posteriormente mediante una lámpara de fluorescencia y una lupa. Para evitar diferencias de temperatura en la incubación de bloques de placas de microtitulación, se depositaron las placas individualmente, sin apilar y tapadas para evitar la evaporación. Se consideró positivo el crecimiento si había un botón de 2 mm de diámetro de crecimiento del microorganismo. La interpretación de los resultados se facilitó tomando siempre como referencia el crecimiento observado en el pocillo usado como control (sin fármaco). Las cepas utilizadas como control positivo y negativo fueron *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) y *Escherichia coli* (ATCC 25922) respectivamente.

Se definió la concentración mínima inhibitoria (MIC) de cada cepa como aquella concentración de antibacteriano más baja que inhibía el crecimiento bacteriano. A partir de este dato, se definen las MIC₅₀ y MIC₉₀ como aquellas concentraciones de antibacteriano que producen la inhibición del crecimiento bacteriano en la mitad de las cepas y en 9 de cada 10 cepas estudiadas respectivamente.

Las cepas utilizadas se cultivaron diariamente. Las concentraciones mínimas inhibitorias fueron en todos los casos del mismo rango de valores.

3.9.2 CONCENTRACIONES PREVENTIVAS DE MUTANTES, VENTANA DE SELECCIÓN DE MUTANTES E ÍNDICE DE PREVENCIÓN DE MUTANTES.

Se define la concentración preventiva de mutantes (MPC) como la concentración de antimicrobiano que previene el crecimiento de los microorganismos menos susceptibles

cuando se utilizan inóculos con elevadas cantidades de bacterias ($\geq 10^9$), empleando el método de dilución en agar (Mouton y cols., 2005). Es una metodología similar a la obtención de la CMI en placa, pero con un inóculo mil a diez mil veces más concentrado (del orden de 10^9 CFU/mL). Es necesario, por tanto, un método de crecimiento y posterior preconcentración de las células antes de su inoculación en placa.

Las MPC se obtuvieron mediante el método de dilución en placa descrito en la bibliografía (Blondeau y cols, 2004 and Firsov y cols., 2003). Tras incubar las bacterias durante 20-24 horas a 37°C se recoge el crecimiento de la cepa sembrada (y se suspenden en un bote con 100 mL de caldo de cultivo Mueller-Hinton y se llevan a incubación durante 24 horas). Teóricamente, después de esta incubación, el número de CFU/mL debe ser del orden de 3×10^8 y debe proporcionar un valor aproximado de 1.00 en la escala de MacFarland. Una vez medidos, y comprobados estos valores, se toman porciones de 10 mL en tubos estériles de plástico y se centrifugan durante 30 minutos a 5000 g. Se elimina el sobrenadante y las bacterias resultantes se resuspenden en 3 mL de caldo de cultivo fresco Mueller-Hinton. Las colonias deben ser aproximadamente del orden de 10^{10} CFU/mL. Tras agitar y homogeneizar, se inoculan 200 μL de la cepa a estudio en una placa de agar preparada con la dilución de fármaco correspondiente, en los 13 niveles de dilución establecidos (0,03 – 128 $\mu\text{g/mL}$) siendo el inóculo final de $N_0 \approx 10^9$ CFU/mL. Se incuban las placas durante 24-48 h en la estufa a 38°C . Se leen los resultados con una lupa y una luz fluorescente.

La MPC se considerará aquella concentración de antibacteriano a partir de la cual no se aprecia crecimiento observable del microorganismo tras la incubación durante 24-48 h. De igual manera, se definen las MPC₅₀ y MPC₉₀ como aquellas MPC que inhiben el crecimiento en la mitad y en el 90 % de las cepas de la población estudiada respectivamente.

Teóricamente la MPC debe ser mayor que la MIC, pero cuanto más parecido sea el valor, es decir que el ratio MPC/MIC o índice de prevención de mutantes (MPI) sea cercano a 1, menor será la capacidad de la cepa (supuestamente) de mutar y la ventana de selección de mutantes, definida como la diferencia entre MPC – MIC, menor. A menor MPC, mayor posibilidad de minimizar la aparición de resistencias, es decir, que se pueden alcanzar niveles plasmáticos de fármaco (definido por los ratios $\text{AUC}_{24}/\text{MIC}_{90}$ y $\text{AUC}_{24}/\text{MPC}_{90}$) que destruyan tanto a las cepas por encima de la CMI (más susceptibles), como a las cepas con capacidad de mutar (menos susceptibles y definidas por la MPC

4.-RESULTADOS

4.1.- ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA DE MARBOFLOXACINO.

Los valores de concentración plasmática de marbofloxacino, obtenidos tras la administración intravenosa de 2 mg/kg de marbofloxacino de peso a cabras, junto con sus valores medios y estadísticos asociados se muestran en la Tabla 1. En todos los casos, se observa como, en los animales, se produce un descenso rápido de las concentraciones durante las primeras 6-8 horas tras la administración. Posteriormente, ese descenso continúa pero de manera más sostenida. Este hecho se puede corroborar observando el gráfico 1 con la representación semilogarítmica correspondiente a cada animal, y en el gráfico 2 en escala semilogarítmica para las concentraciones medias experimentales.

Tiempo	Concentración plasmática para los animales sometidos a estudio (cabras)								
	1	2	3	4	5	6	Media	S.D.	C.V.
0,083	4673,49	5805,25	3753,91	4580,92	4060,93	4413,93	4548,07	704,74	15,50
0,166	4162,67	4905,80	2941,77	3746,12	3829,77	4317,47	3983,93	657,19	16,50
0,25	3756,30	3924,70	2584,19	3147,41	3257,85	3343,65	3335,68	475,43	14,25
0,5	3070,65	3557,26	2448,68	2436,92	2517,01	2816,70	2807,87	443,15	15,78
0,75	2506,93	3007,19	2189,82	1714,69	2104,42	2258,13	2296,86	433,04	18,85
1,00	2475,81	1857,51	1732,06	1149,23	1666,04	1910,29	1798,49	428,54	23,83
1,50	1800,87	1550,66	1316,27	951,27	1170,13	1493,59	1380,46	300,36	21,76
2,00	1348,73	1264,69	886,41	784,84	920,41	1178,85	1063,99	230,06	21,62
4,00	610,26	464,53	320,62	362,60	336,13	459,51	425,61	109,32	25,69
6,00	309,17	188,38	161,05	88,93	140,80	195,98	180,72	73,75	40,81
8,00	115,25	55,06	72,73	53,32	61,58	103,34	76,88	26,29	34,19
10,00	92,39	42,82	46,55	43,32	35,01	61,45	53,59	20,90	39,00
12,00	53,29	24,09	29,22	22,69	25,40	48,80	33,91	13,52	39,87
24,00	10,45	4,58	13,00	9,15	8,29	15,63	10,18	3,84	37,69
32,00	3,25			4,92		7,25	5,14	2,01	39,09

Tabla 1.- Concentraciones plasmáticas experimentales de marbofloxacino ($\mu\text{g/L}$) en función del tiempo (h), en cada cabra tras la administración intravenosa de una dosis de 2 mg/kg junto con los parámetros estadísticos asociados.

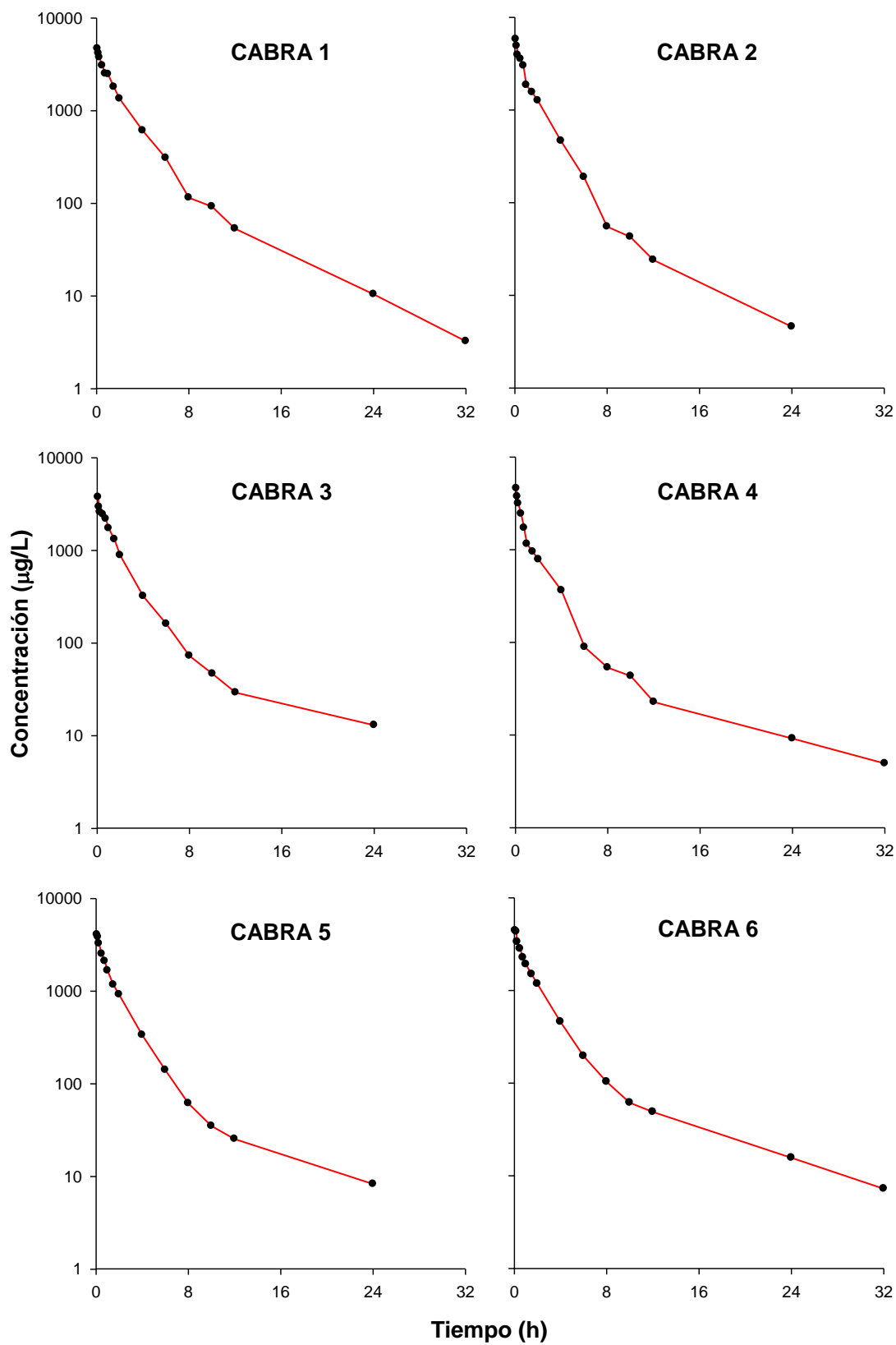


Gráfico 1.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones experimentales de marbofloxacin obtenidas tras la administración intravenosa de una dosis de 2 mg/kg a cada cabra.

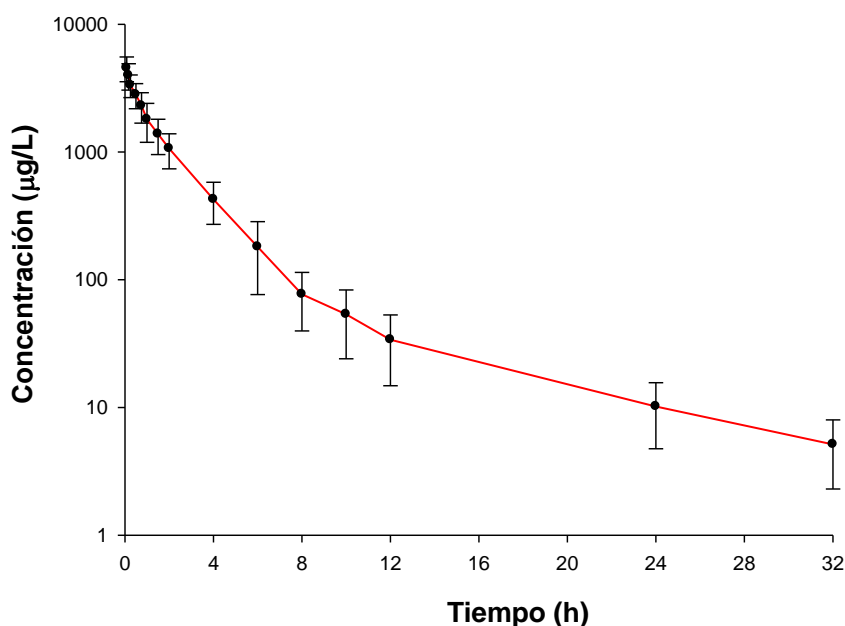


Gráfico 2.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de marbofloxacino obtenidas en cabras tras la administración intravenosa de una dosis de 2 mg/kg.

Para estudiar la homogeneidad de los datos, se ha realizado un análisis de la varianza no paramétrico (test de Kruskal-Wallis) en el que se han establecido como hipótesis nulas, que las concentraciones de marbofloxacino no varían entre animales (hipótesis que se debe aceptar para confirmar que no hay diferencia entre animales y por tanto la homogeneidad del lote) y que no varían entre tiempos (hipótesis que se debe rechazar porque la evolución de las concentraciones en función del tiempo) (Tabla 2). En síntesis, una vez comprobada la no existencia de diferencias significativas entre animales, la única fuente de variación que queda será el tiempo, por lo que se manifiesta homogeneidad a un tiempo determinado en las concentraciones.

Pruebas de Bondad de Ajuste para la Concentración		
Prueba de Kruskal-Wallis para Concentración por Animales	Valor-P*	0,96
Prueba de Kruskal-Wallis para Concentración por Tiempo	Valor-P*	$1,89 \times 10^{-11}$

* Se compara con un valor de probabilidad de 0,05 para un 95% de nivel de confianza.

Tabla 2.- Test de Kruskal-Wallis para las concentraciones plasmáticas de marbofloxacino tras la administración intravenosa de una dosis de 2mg/kg a cabras.

Estudiada la homogeneidad de los datos, se ha procedido al ajuste de los mismos a modelos compartimentales, ponderando respecto al inverso de las concentraciones al cuadrado mediante regresión no lineal y utilizando el Criterio de Información de Akaike AIC (Yamaoka y cols., 1978a) como criterio de elección del modelo. Así los datos obtenidos se ajustan mejor a un modelo bicompartimental abierto (biexponencial) que es el que en todos los casos proporciona un menor valor de AIC. Los parámetros derivados de dicho modelo se muestran en la Tabla 3, mientras que la Tabla 4 muestra los resultados del análisis farmacocinético no compartimental.

Parámetros	Animales sometidos a estudio (cabras)								
	1	2	3	4	5	6	Media	S.D.	C.V.
C_0 ($\mu\text{g/L}$)	5246,99	6869,61	4790,27	5601,76	4306,03	4512,56	5221,20	936,82	17,94
C_1 ($\mu\text{g/L}$)	3911,39	4430,25	3079,70	3020,38	3432,29	3685,29	3593,22	534,43	14,87
C_z ($\mu\text{g/L}$)	268,88	113,02	223,30	75,55	249,25	143,09	178,85	79,15	44,25
$t_{1/2\lambda_1}$ (h) *	1,23	1,08	1,04	1,00	0,95	1,15	1,07		
$t_{1/2\lambda_z}$ (h) *	5,05	5,20	4,15	7,98	3,59	7,45	5,61		
λ_1 (1/h)	0,56	0,64	0,66	0,70	0,73	0,60	0,65	0,06	9,50
λ_z (1/h)	0,14	0,13	0,17	0,09	0,19	0,09	0,14	0,04	30,52
k_{10} (1/h)	0,47	0,59	0,55	0,59	0,62	0,50	0,55	0,06	10,44
k_{12} (1/h)	0,07	0,04	0,08	0,09	0,08	0,08	0,07	0,02	22,17
k_{21} (1/h)	0,16	0,15	0,20	0,10	0,23	0,11	0,16	0,05	31,32

*: Media armónica de los valores calculados para las semividas.

Tabla 3.- Parámetros farmacocinéticos bicompartimentales deducidos tras la administración intravenosa de marbofloxacino, a dosis de 2 mg/kg, a cada una de las cabras a partir de sus correspondientes ecuaciones de ajuste, junto con los parámetros estadísticos asociados.

Parámetros	Animales sometidos a estudio (cabras)								
	1	2	3	4	5	6	Media	S.D.	C.V.
AUC_{0-24} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$)	8925,64	7968,48	6088,76	5533,12	6094,65	7539,87	7025,09	1321,78	18,82
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$)	8996,90	7999,69	6221,81	5638,82	6167,09	7693,70	7119,67	1306,48	18,35
MRT (h)	3,03	2,20	3,29	2,95	2,70	3,44	2,94	0,44	15,09
Cl (L/kg/h)	0,22	0,25	0,32	0,35	0,32	0,26	0,29	0,05	17,94
Vc (L/kg)	0,47	0,42	0,58	0,59	0,52	0,52	0,52	0,06	11,54
Vss (L/kg)	0,67	0,55	1,06	1,05	0,88	0,90	0,85	0,20	23,87
Vz (L/kg)	1,50	1,70	3,29	3,68	2,83	2,39	2,57	0,87	33,78

Tabla 4.- Parámetros farmacocinéticos no compartimentales obtenidos para cada cabra tras la administración intravenosa de marbofloxacino a dosis de 2 mg/kg, junto con los parámetros estadísticos asociados.

4.2.- ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA DE MARBOFLOXACINO.

La tabla 5 muestra los valores de concentración plasmática de marbofloxacino obtenidos tras la administración subcutánea de una dosis de 2 mg/kg de peso, junto con sus valores medios y estadísticos asociados. Se observa como en los seis animales, a partir del primer tiempo de extracción la concentración del fármaco va aumentando hasta aproximadamente las 0,5 – 1,5 horas, y posteriormente va descendiendo paulatinamente, detectándose concentraciones plasmáticas hasta las 32 horas tras la administración. Este hecho se puede corroborar observando los Gráficos 3 y 4, para las representaciones individuales y promediadas en escala semilogarítmica.

Tiempo	Concentración plasmática para los animales sometidos a estudio (cabras)								
	1	2	3	4	5	6	Media	S.D.	C.V.
0,08	209,47	529,14	542,90	278,16	320,16	254,53	355,73	144,24	40,55
0,17	781,53	1275,23	1256,99	510,66	871,76	505,82	867,00	341,61	39,40
0,25	1117,88	1487,78	1812,10	673,42	1298,59	744,09	1188,98	437,80	36,82
0,50	2133,42	2211,62	2141,83	870,16	2073,68	1401,53	1805,37	546,91	30,29
0,75	2572,64	2214,86	2287,47	1029,30	2003,72	1651,38	1959,89	549,71	28,05
1,00	2745,44	2645,36	2681,17	1005,62	2086,51	1748,08	2152,03	686,62	31,91
1,50	2677,12	2354,29	2094,40	1036,34	1937,72	1596,72	1949,43	578,40	29,67
2,00	2356,37	1741,91	1999,33	818,25	1789,48	1391,28	1682,77	529,38	31,46
4,00	1180,96	806,98	717,02	310,43	896,73	549,71	743,64	298,22	40,10
6,00	623,49	379,91	434,16	152,13	391,39	279,33	376,73	157,70	41,86
8,00	290,52	144,74	129,86	81,05	164,70	190,86	166,96	70,84	42,43
10,00	142,54	73,69	59,23	48,63	87,17	66,19	79,57	33,49	42,09
12,00	86,65	47,42	44,76	31,05	59,04	40,09	51,50	19,51	37,88
24,00	30,25	15,58	9,33	12,98	19,68	6,98	15,80	8,38	53,07
32,00	13,26	6,64	2,94	6,07	8,05	2,13	6,51	4,00	61,43

Tabla 5.- Concentraciones plasmáticas experimentales de marbofloxacino (µg/L) en función del tiempo (h), en cada cabra tras la administración subcutánea de una dosis de 2 mg/kg junto con los parámetros estadísticos asociados.

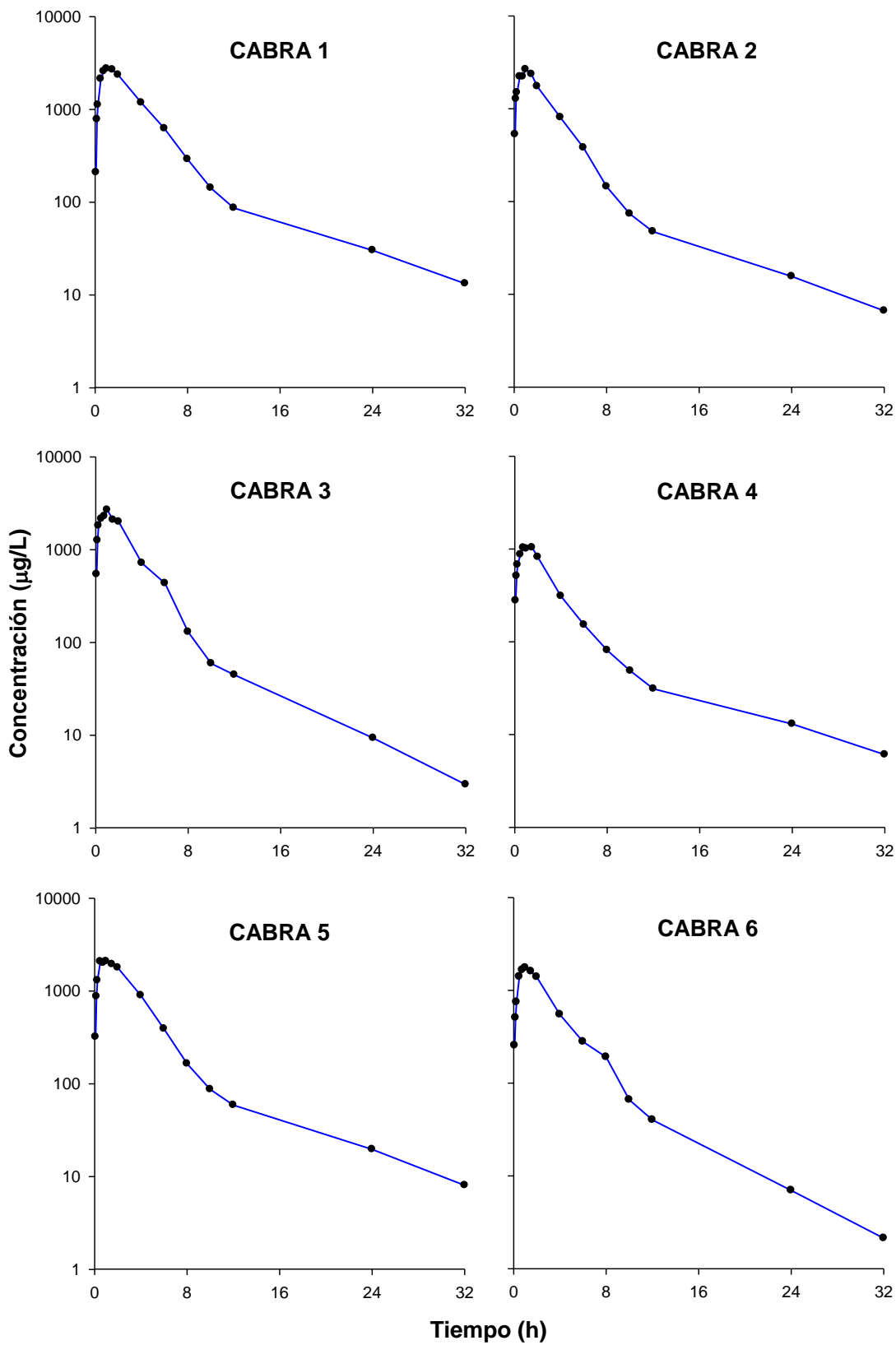


Gráfico 3.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones experimentales de marbofloxacin obtenidas tras la administración subcutánea de una dosis de 2 mg/kg a cada cabra.

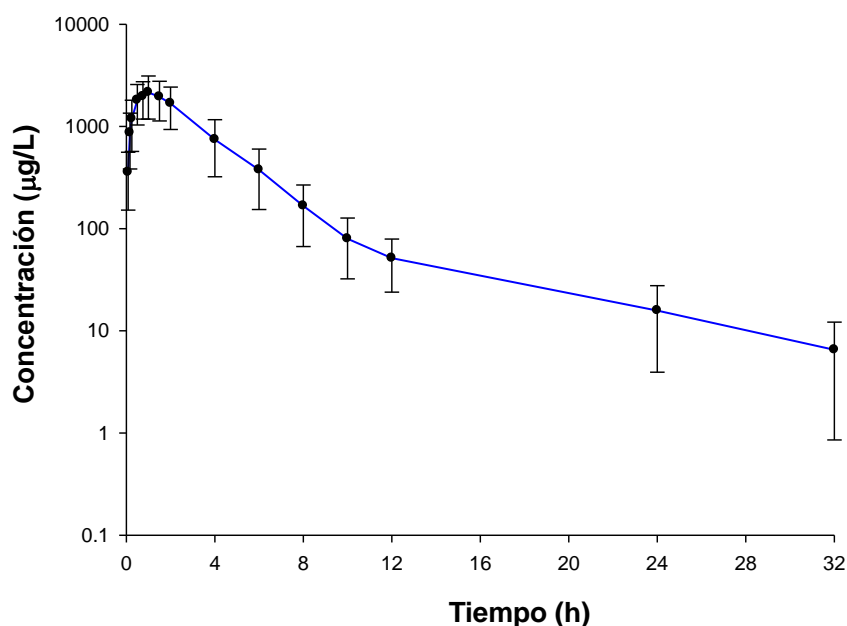


Gráfico 4.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de marbofloxacino obtenidas tras la administración subcutánea de una dosis de 2 mg/kg a cabras.

La homogeneidad de los datos, al igual que en la administración intravenosa, se ha estudiado mediante el análisis de la varianza no paramétrico (test de Kruskal-Wallis) (Tabla 6).

Pruebas de Bondad de Ajuste para la Concentración		
Prueba de Kruskal-Wallis para Concentración por Animales	Valor-P*	0,67
Prueba de Kruskal-Wallis para Concentración por Tiempo	Valor-P*	$7,08 \times 10^{-12}$

* Se compara con un valor de probabilidad de 0,05 para un 95% de nivel de confianza

Tabla 6.- Test de Kruskal-Wallis para las concentraciones plasmáticas de marbofloxacino tras la administración subcutánea de una dosis de 2 mg/kg a cabras.

Las concentraciones experimentales medidas en cada animal se han ajustado a modelos compartimentales con ponderaciones respecto al inverso del cuadrado de las concentraciones, obteniendo mejores resultados utilizando un modelo bicompartimental abierto con absorción (triexponencial) que es el modelo que proporciona valores más bajos del parámetro AIC. La tabla 7 muestra los valores de los parámetros farmacocinéticos obtenidos tras este análisis, en tanto que la tabla 8 recoge los correspondientes al análisis no compartimental.

Parámetros	Animales sometidos a estudio (cabras)								
	1	2	3	4	5	6	Media	S.D.	C.V.
$C_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{g/L}$)	2696,61	2515,86	2536,01	1079,57	2193,40	1668,23	2114,95	625,15	29,56
$T_{m\acute{a}x}$ (h)	1,39	0,95	0,91	0,88	1,20	1,16	1,08	0,20	18,69
C_1 ($\mu\text{g/L}$)	13315,49	5223,40	5030,66	1991,15	6727,09	18873,17	8526,83	6309,80	74,00
C_z ($\mu\text{g/L}$)	236,92	93,77	47,08	70,08	140,17	662,17	208,36	232,24	111,46
C_a ($\mu\text{g/L}$)	13552,40	5317,17	5077,74	2061,23	6867,26	19535,34	8735,19	6525,94	74,71
λ_1 (1/h)	0,56	0,50	0,48	0,49	0,53	0,84	0,57	0,14	24,49
λ_z (1/h)	0,09	0,08	0,07	0,07	0,09	0,22	0,10	0,06	54,88
k_a (1/h)	0,94	1,95	2,10	2,27	1,27	1,03	1,42	0,19	38,08
$t_{\frac{1}{2}\lambda_1}$ (h)*	1,24	1,40	1,44	1,41	1,31	0,82	1,22		
$t_{\frac{1}{2}\lambda_z}$ (h)*	7,77	8,57	10,43	9,30	7,93	3,21	6,77		
$t_{\frac{1}{2}\lambda_a}$ (h)*	0,73	0,35	0,33	0,31	0,54	0,67	0,49		

*: Media armónica para los valores de las semividas.

Tabla 7.- Parámetros farmacocinéticos bicompartimentales deducidos tras la administración subcutánea de marbofloxacino, a dosis de 2 mg/kg, a cada una de las cabras a partir de sus correspondientes ecuaciones de ajuste junto con sus valores medios y estadísticos asociados.

Parámetros	Animales sometidos a estudio (cabras)								
	1	2	3	4	5	6	Media	S.D.	C.V.
AUC_{0-24} ($\mu\text{g}\times\text{h/L}$)	11705,20	8825,31	8824,03	3922,27	8678,34	6393,58	8058,12	2635,79	32,71
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\times\text{h/L}$)	12000,37	8972,04	8932,43	4061,97	8856,99	6440,60	8210,73	2691,66	32,78
MRT_{sc} (h)	4,70	3,81	3,56	4,86	4,27	3,69	4,15	0,55	13,23
MAT_{sc} (h)	1,67	1,60	0,27	1,91	1,56	0,24	1,21	0,75	61,96
F_{sc} (%)	133,38	112,18	143,57	72,04	103,62	83,71	108,08	27,67	25,60

Tabla 8.- Parámetros farmacocinéticos no compartimentales obtenidos para cada cabra tras la administración subcutánea de marbofloxacino a dosis de 2 mg/kg junto con sus valores medios y estadísticos asociados.

4.3.- ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA DE MARBOFLOXACINO EN SOLUCIÓN DEL POLÍMERO P407 AL 25%.

Los valores de concentración plasmática de marbofloxacino obtenidos tras la administración subcutánea de una dosis de marbofloxacino, en solución del polímero P407 al 25%, de 6 mg/kg de peso a cabras aparecen reflejados en la Tabla 9 junto con sus valores medios y estadísticos asociados. En los seis animales, la concentración del fármaco sigue una evolución semejante a lo largo del tiempo, aumentando hasta aproximadamente las 2-4 horas tras la administración del fármaco y, descendiendo posteriormente de una manera gradual, detectándose concentraciones plasmáticas hasta las 48 horas.

Tiempo	Concentración plasmática para los animales sometidos a estudio (cabras)								
	1	2	3	4	5	6	Media	S.D.	C.V.
0,08	69,39	78,22	129,99	54,16	116,68	67,52	85,99	30,23	35,15
0,17	177,57	250,87	491,47	100,49	363,03	319,19	283,77	139,02	48,99
0,25	326,02	383,75	892,92	217,99	687,28	434,47	490,41	251,60	51,31
0,50	520,87	781,28	1569,65	518,51	1410,28	891,65	948,71	446,77	47,09
0,75	665,89	1174,93	2119,23	783,59	2124,87	1113,04	1330,26	642,72	48,32
1,00	981,38	1566,93	3015,67	1016,32	2422,69	1383,05	1731,01	818,47	47,28
1,50	1217,29	1930,90	3710,08	1395,95	2695,34	1634,41	2097,33	945,20	45,07
2,00	1379,88	2283,09	4059,98	1677,66	3102,59	1736,73	2373,32	1025,76	43,22
4,00	1916,80	3432,28	3311,79	2132,09	2354,24	1630,45	2462,94	744,68	30,24
6,00	1769,68	2699,42	2094,50	2002,60	1420,55	1148,85	1855,93	545,32	29,38
8,00	981,39	1767,96	1185,85	1489,07	678,38	978,64	1180,21	393,16	33,31
10,00	773,96	1161,27	608,55	1174,49	356,32	762,35	806,16	318,16	39,47
12,00	511,94	624,63	292,39	763,56	262,52	512,48	494,59	192,15	38,85
24,00	79,32	66,43	32,94	136,26	45,58	74,52	72,51	35,90	49,51
32,00	51,23	39,19	20,50	83,04	34,34	46,34	45,77	21,13	46,16
48,00	22,93	18,90	10,85	32,33	22,46	21,10	21,43	6,94	32,38

Tabla 9.- Concentraciones plasmática experimentales de marbofloxacino ($\mu\text{g/L}$) en cada cabra a los distintos tiempos de extracción (h) tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% junto con sus valores medios y estadísticos de desviación.

Las representaciones gráficas semilogarítmicas de las concentraciones plasmáticas para cada animal, junto con los valores medios (media \pm SD), tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% se muestran en los Gráficos 5 y 6, a los distintos tiempos de extracción.

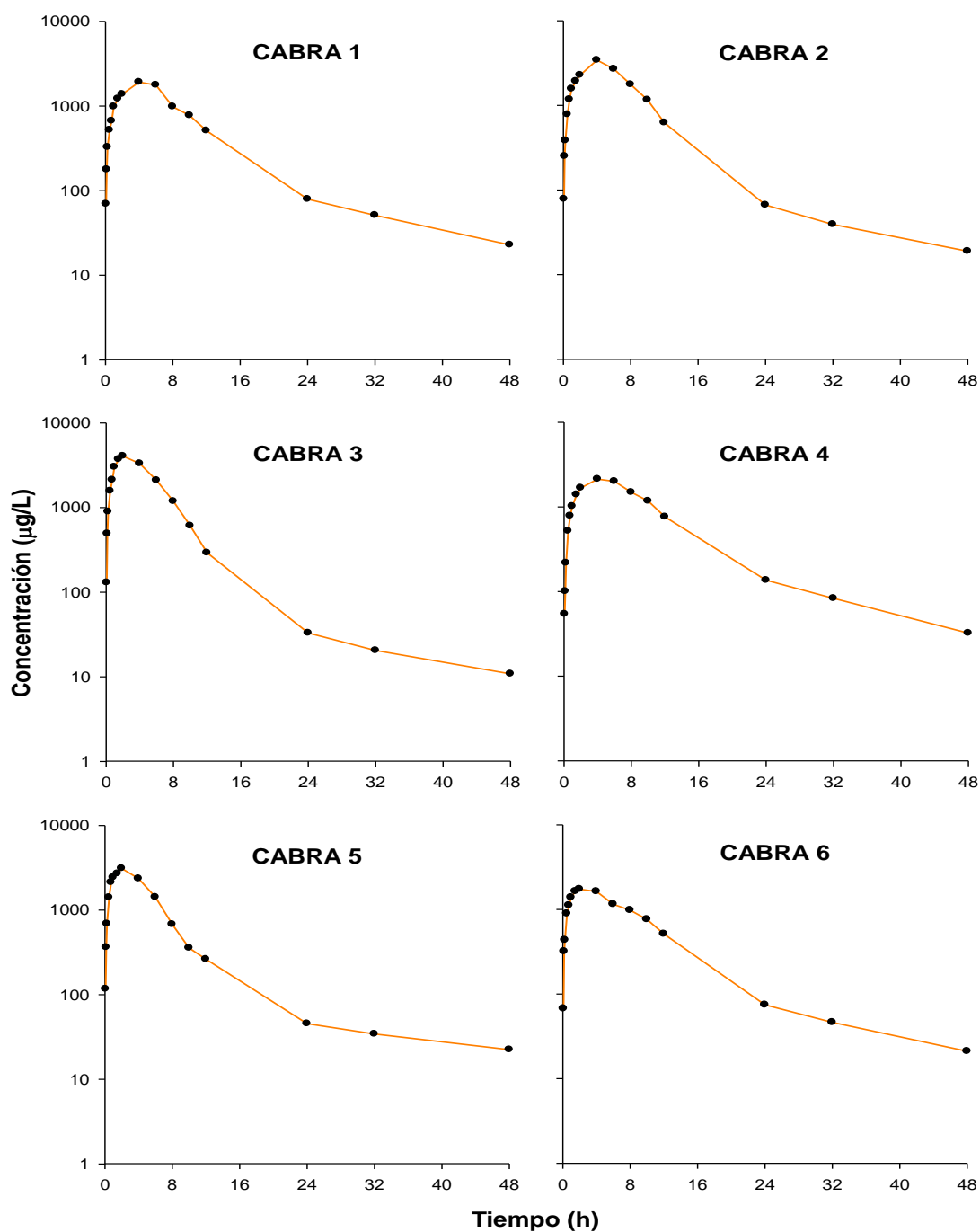


Gráfico 5.- Representación gráfica de las concentraciones experimentales semilogarítmicas de marbofloxacin obtenidas tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% a cada cabra.

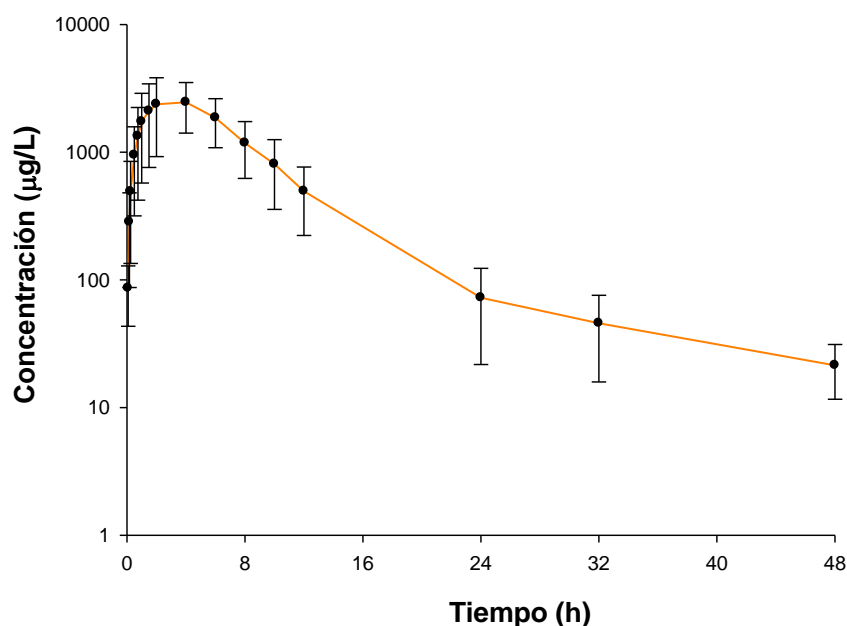


Gráfico 6.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de marbofloxacino obtenidas tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% a cabras.

La homogeneidad de los datos, como en los casos anteriores y con idénticas premisas, se ha estudiado mediante el test de Kruskal-Wallis (Tabla 10).

Pruebas de Bondad de Ajuste para la Concentración		
Prueba de Kruskal-Wallis para Concentración por Tiempo	Valor-P*	$1,05 \times 10^{-07}$
Prueba de Kruskal-Wallis para Concentración por Animales	Valor-P*	0,67

* Se compara con un valor de probabilidad de 0,05 para un 95% de nivel de confianza

Tabla 10.- Test de Kruskal-Wallis para las concentraciones plasmáticas de marbofloxacino en solución del polímero P407 al 25%, administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg a cabras.

Al igual que en las administraciones anteriores, se han ajustado las concentraciones plasmáticas obtenidas a diferentes modelos compartimentales con ponderación respecto de las inversas de las concentraciones al cuadrado y escogiendo el que presenta un valor de AIC más bajo que siempre ha sido el que corresponde al bicompartimental abierto con absorción (trixponencial).

Los parámetros correspondientes al ajuste bicompartimental, para cada uno de los animales y para sus valores medios y estadísticos asociados, se muestran en la Tabla 11, mientras que los parámetros no compartimentales se muestran en la tabla 12.

Parámetros	Animales sometidos a estudio (cabras)								
	1	2	3	4	5	6	Media	S.D.	C.V.
$C_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{g/L}$)	1916,80	3432,28	4060	2132,09	3102,59	1736,73	2730,08	938,75	34,39
$T_{m\acute{a}x}$ (h)	4,00	4,00	2,00	4,00	2,00	2,00	3,00	1,10	36,51
C_1 ($\mu\text{g/L}$)	44570	171400	132470	33380	139199	3445,76	77123	68941	89,39
C_z ($\mu\text{g/L}$)	222,6	98,55	115,11	50,39	200,55	52,82	101,25	86,00	84,94
C_a ($\mu\text{g/L}$)	44830	171600	132977	33490	139553	3550,61	87667	68755	78,43
λ_1 (1/h)	0,28	0,30	0,44	0,22	0,48	0,17	0,33	0,15	47,53
λ_z (1/h)	0,06	0,05	0,05	0,04	0,06	0,04	0,04	0,01	24,30
k_a (1/h)	0,31	0,31	0,48	0,26	0,51	0,79	0,51	0,22	43,31
$t_{\frac{1}{2}\lambda_1}$ (h)*	2,46	2,31	1,58	3,17	1,45	4,11	2,21		
$t_{\frac{1}{2}\lambda_z}$ (h)*	11,79	13,72	14,13	18,45	12,20	17,86	14,26		
$t_{\frac{1}{2}\lambda_a}$ (h)*	2,24	2,21	1,45	2,71	1,37	0,88	1,57		

*: Media armónica de los valores calculados para las semividas.

Tabla 11.- Parámetros farmacocinéticos bicompartimentales deducidos tras la administración subcutánea de marbofloxacino en solución del polímero P407 al 25%, a dosis de 6 mg/kg a cada una de las cabras a partir de sus correspondientes ecuaciones de ajuste junto con sus valores medios y estadísticos de desviación.

Parámetros	Animales sometidos a estudio (cabras)								
	1	2	3	4	5	6	Media	S.D.	C.V.
AUC_{24} ($\mu\text{g} \times \text{h/L}$)	17147,70	26530,65	24998,09	22210,33	18298,98	16332,23	20919,66	4287,72	20,50
AUC_{∞} ($\mu\text{g} \times \text{h/L}$)	18674,73	27776,35	25702,49	24474,19	19855,40	17734,86	22369,67	4152,70	18,56
MRT_{sc1} (h)	10,21	8,29	6,12	10,93	9,33	9,92	9,14	1,72	18,86
MAT_{sc1} (h)	7,19	6,09	2,83	7,98	6,63	6,48	6,20	1,78	28,64
F_{sc1} (%)	69,19	115,76	137,70	144,68	107,32	76,84	101,58	15,87	28,43

Tabla 12.- Parámetros farmacocinéticos no compartimentales obtenidos para cada cabra tras la administración subcutánea de marbofloxacino en solución del polímero P407 al 25% a una dosis de 6 mg/kg ajuste junto con sus valores medios y estadísticos de desviación.

4.4.- ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA DE MARBOFLOXACINO EN SOLUCIÓN DEL POLÍMERO P407 AL 25% + CARBOXIMETILCELULOSA AL 2%.

La Tabla 13 muestra los valores de concentración plasmática de marbofloxacinó obtenidos tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg de peso en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% junto con los estadísticos de desviación. Vemos que en los seis animales, a partir del primer tiempo de extracción, la concentración del fármaco va aumentando hasta aproximadamente las 2-6 horas, y posteriormente va descendiendo de manera gradual, detectándose concentraciones hasta las 48 horas.

Tiempo	Concentración plasmática para los animales sometidos a estudio (cabras)								
	1	2	3	4	5	6	Media	S.D.	C.V.
0,08	46,41	66,70	23,62	39,37	44,61	40,01	43,45	13,95	32,09
0,17	165,70	266,29	99,45	75,01	223,83	115,09	157,56	75,20	47,73
0,25	275,40	367,45	150,15	132,53	400,23	250,11	262,65	109,38	41,64
0,50	538,88	846,79	396,24	280,72	645,93	577,73	547,72	197,13	35,99
0,75	849,39	1411,03	685,58	498,49	888,58	843,48	862,76	305,26	35,38
1,00	1096,60	1720,54	912,66	859,94	1113,11	1056,28	1126,52	308,44	27,38
1,50	1440,05	2345,53	1357,22	1210,94	1243,88	1115,67	1452,22	452,12	31,13
2,00	1696,04	2947,42	1583,99	1359,19	1518,15	1361,66	1744,41	603,56	34,60
4,00	1893,36	2610,00	1753,04	2198,12	1722,14	1544,63	1953,55	388,67	19,90
6,00	1769,96	2264,38	1567,54	1725,33	1484,87	1331,82	1690,65	323,39	19,13
8,00	1136,55	844,29	1020,64	1183,95	1011,89	750,18	991,25	166,88	16,84
10,00	629,70	378,78	547,86	506,94	466,02	487,61	502,82	83,80	16,67
12,00	286,11	124,59	403,08	301,56	236,22	312,16	277,29	92,42	33,33
24,00	59,00	40,42	58,36	31,26	44,72	29,21	43,83	12,85	29,31
32,00	36,57	26,72	36,06	19,02	19,64	17,05	25,84	8,75	33,85
48,00	14,74	14,55	18,31	8,03	8,85	7,90	12,06	4,39	36,38

Tabla 13- Concentraciones plasmática experimentales de marbofloxacinó ($\mu\text{g/L}$) en cada cabra a los diferentes tiempos (h) tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% junto con sus estadísticos asociados.

Las representaciones gráficas de las concentraciones plasmáticas obtenidas en cada animal tras su administración subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2%, junto con los valores medios de las concentraciones plasmáticas

(media \pm SD), a los distintos tiempos de extracción, se muestran en los Gráficos 7 y 8 respectivamente.

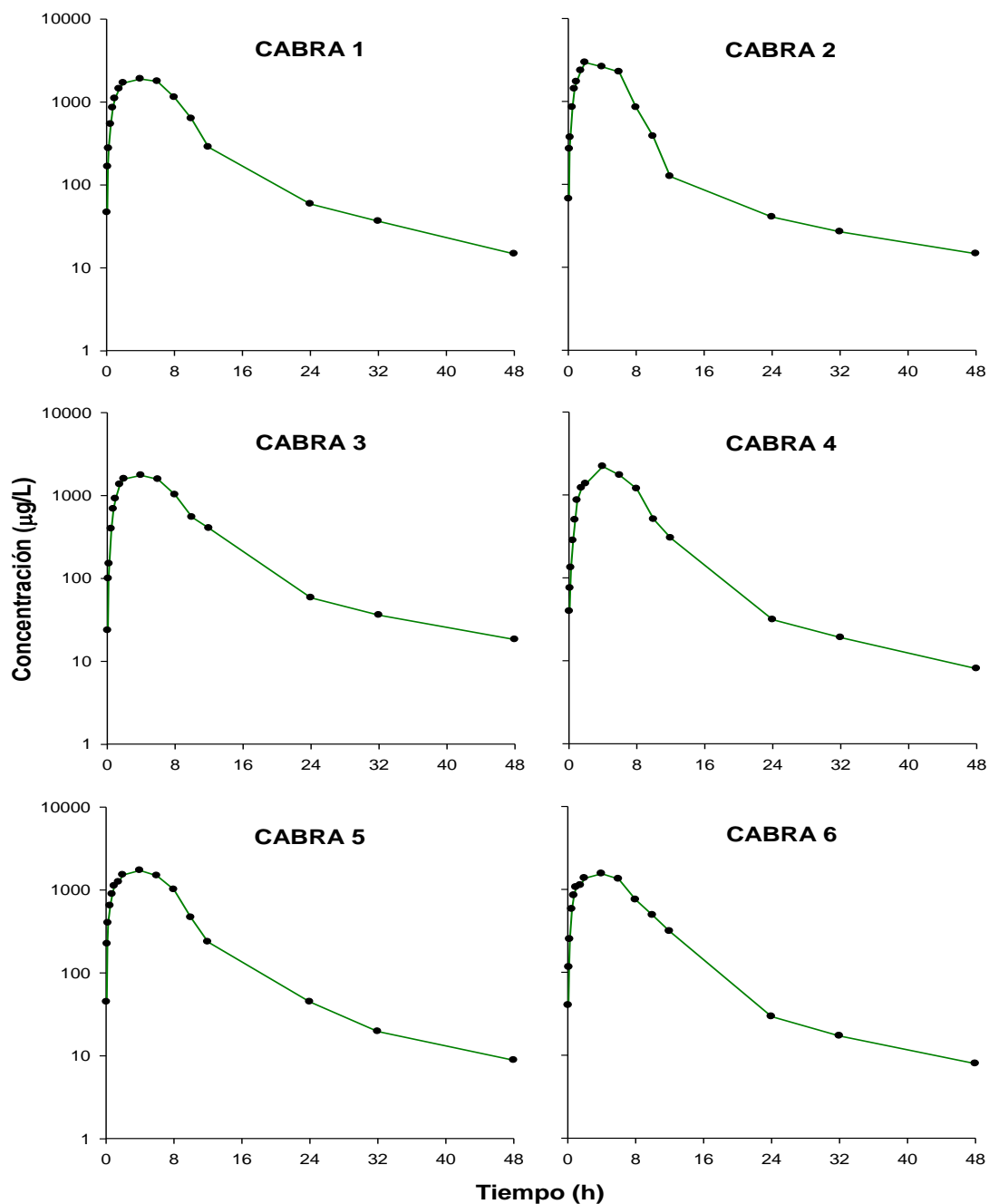


Gráfico 7.- Representación gráfica de las concentraciones experimentales semilogarítmicas de marbofloxacino obtenidas tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2%, a cada cabra.

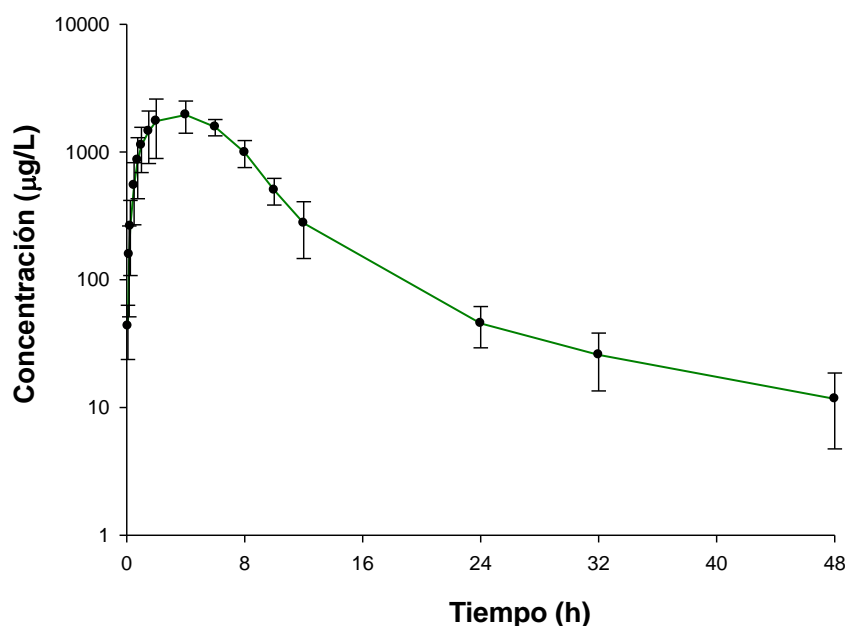


Gráfico 8.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de marbofloxacino obtenidas tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% a cabras.

La homogeneidad de los datos se ha estudiado con el test de Kruskal-Wallis como en los casos anteriores (Tabla 14).

Pruebas de Bondad de Ajuste para la Concentración		
Prueba de Kruskal-Wallis para Concentración por Animales	Valor-P*	0,40
Prueba de Kruskal-Wallis para Concentración por Tiempo	Valor-P*	$3,48 \times 10^{-08}$

* Se compara con un valor de probabilidad de 0,05 para un 95% de nivel de confianza

Tabla 14- Test estadísticos de Kruskal-Wallis para las concentraciones plasmáticas de marbofloxacino en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2%, administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg a cabras¹

También en este caso, se han ajustado los datos experimentales a modelos compartimentales con ponderación respecto del inverso del cuadrado de las concentraciones. Los mejores resultados se han obtenido para un modelo bicompartimental abierto con absorción (trixponencial) que es el que presenta menores valores de AIC. A su vez, los parámetros

correspondientes al ajuste, se presentan en la Tabla 15, mientras que los parámetros correspondientes al análisis no compartimental se muestran en la tabla 16.

Parámetros	Animales sometidos a estudio (cabras)								
	1	2	3	4	5	6	Media	S.D.	C.V.
$C_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{g/L}$)	1893,36	2947,42	2088,84	2198,12	1722,14	1544,63	2065,75	492,90	23,86
$T_{m\acute{a}x}$ (h)	4,00	2,00	6,00	4,00	4,00	4,00	4,00	1,26	31,62
C_1 ($\mu\text{g/L}$)	47731	139306	110100	44402	37113	5980	64105,33	45705,82	71,30
C_z ($\mu\text{g/L}$)	56,6	102,1	12,47	46,72	87,98	40,72	58,47	32,69	55,91
C_a ($\mu\text{g/L}$)	47830	139499	110201	44490	37308	6168	64248	50067	77,93
λ_1 (1/h)	0,3046	0,4282	0,2539	0,26	0,35	0,24	0,29	0,06	19,98
λ_z (1/h)	0,04308	0,04566	0,0281	0,04	0,05	0,04	0,05	0,01	14,22
k_a (1/h)	0,3303	0,4480	0,2644	0,28	0,40	0,51	0,40	0,11	28,34
$t_{1/2\lambda_1}$ (h)*	2,28	1,62	2,73	2,63	1,98	2,86	2,26	-	-
$t_{1/2\lambda_z}$ (h)*	16,09	15,18	24,67	16,05	12,86	16,53	16,25	-	-
$t_{1/2\lambda_a}$ (h)*	2,10	1,55	2,62	2,44	1,74	1,36	1,86	-	-

*: Media armónica de los valores calculados para las semividas.

Tabla 15.- Parámetros farmacocinéticos bicompartimentales deducidos tras la administración subcutánea de marbofloxacino en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2%, a dosis de 6 mg/kg, a cada una de las cabras a partir de sus correspondientes ecuaciones de ajuste junto con sus valores medios y estadísticos de desviación.

Parámetros	Animales sometidos a estudio (cabras)								
	1	2	3	4	5	6	Media	S.D.	C.V.
AUC_{0-24} ($\mu\text{g}\times\text{h/L}$)	16391,19	8825,31	24998,09	22210,33	8678,34	6393,58	14582,81	7810,28	53,56
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\times\text{h/L}$)	17408,00	19965,03	16723,67	16195,79	14885,03	13473,57	16441,85	2223,54	13,52
MRT_{SC2} (h)	8,44	7,07	9,11	9,58	7,50	7,75	8,24	0,97	11,82
MAT_{SC2} (h)	5,42	4,87	5,81	6,62	4,79	4,30	5,30	0,83	15,68
F_{SC2} (%)	64,50	83,21	89,60	95,74	80,45	58,37	78,64	14,47	18,40

Tabla 16.- Parámetros farmacocinéticos no compartimentales deducidos tras la administración subcutánea de marbofloxacino en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2%, a dosis de 6 mg/kg, a cada una de las cabras junto con sus valores medios y estadísticos de desviación.

4.5.- COMPARACIÓN DE LOS PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DE MARBOFLOXACINO TRAS SU ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA, SUBCUTÁNEA, SUBCUTÁNEA EN SOLUCIÓN DEL POLÍMERO P407 AL 25% Y SUBCUTÁNEA EN SOLUCIÓN DEL POLÍMERO P407 AL 25% + CARBOXIMETILCELULOSA AL 2%.

Los valores medios de los principales parámetros farmacocinéticos, compartimentales y no compartimentales de marbofloxacino tras la administración intravenosa de una dosis de 2 mg/kg vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC), y subcutáneas de 6 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) aparecen en la Tabla 17.

Parámetros	IV	SC	SC1	SC2
λ_z (1/h)	0,14	0,10	0,04	0,05
$t_{1/2\lambda z}$ (h) *	5,61	6,77	14,26	16,25
k_a (1/h)		0,49	0,51	0,40
$t_{1/2k_a}$ (h) *		1,42	1,57	1,86
C_{max} ($\mu\text{g/L}$)		2114,95	2730,08	2065,75
T_{max} (h)		1,08	3,00	4,00
AUC_{0-24} ($\mu\text{g}\times\text{h/L}$)	7025,09	8058,12	20919,66	14582,81
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\times\text{h/L}$)	7119,67	8210,73	22369,67	16441,85
MRT (h)	2,94	4,15	9,14	8,24
MAT (h)		1,21	6,20	5,30
V_c (L/kg)	0,52			
V_{ss} (L/kg)	0,85			
V_z (L/kg)	2,57			
Cl (L/kg/h)	0,29			
F (%)		108,08	101,58	78,64

*: Media armónica de los valores calculados para las semividas.

Tabla 17.- Valores medios de los principales parámetros farmacocinéticos en plasma tras la administración de una dosis de 2 mg/kg de marbofloxacino por vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC), y de una dosis de 6 mg/kg de marbofloxacino por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2).

La representación gráfica de los valores medios (\pm SD) experimentales de concentración, en escala semilogarítmica, obtenidos a los distintos tiempos de extracción tras la administración de marbofloxacino por las vías IV, SC, SC1 y SC2, aparecen en el Gráfico 9.

También se han representado los valores medios (\pm SD) de las tres administraciones subcutáneas y en escala semilogarítmica en el Gráfico 10.

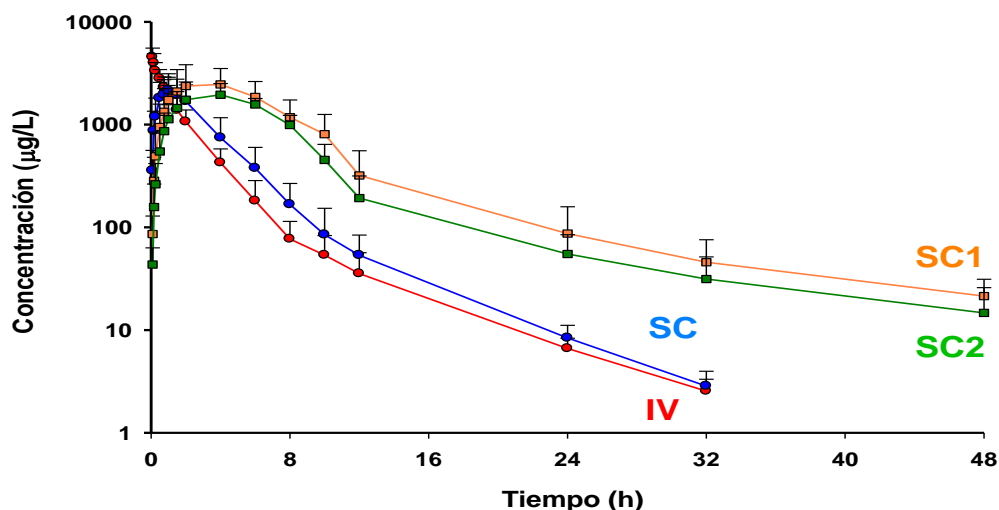


Gráfico 9.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de marbofloxacino obtenidas tras la administración de una dosis de 2 mg/kg vía intravenosa (IV) y vía subcutánea (SC), y de 6mg/kg por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a cabras.

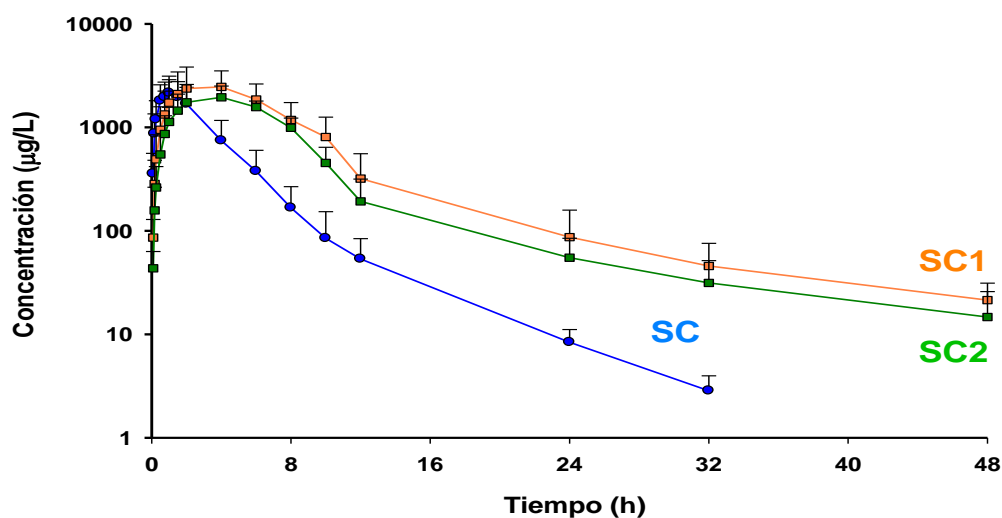


Gráfico 10.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de marbofloxacino obtenidas tras la administración de una dosis de 2 mg/kg vía subcutánea (SC), vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a cabras.

Para analizar la existencia de diferencias significativas entre los parámetros farmacocinéticos procedentes de las diferentes vías de administración y formulaciones del

fármaco, se ha realizado la prueba de Kruskal-Wallis y mostrando en la tabla 18 los valores de probabilidad obtenidos para aceptar o rechazar la hipótesis nula de igualdad del parámetro. En todos los casos se rechaza la hipótesis nula cuando el valor de $P < 0,05$.

Parámetros	P Todas las vías	P Extravasculares	Parámetros	P Todas las vías	P Extravasculares
λ_z (1/h)	$3,2 \times 10^{-04}$		AUC_{0-24} ($\mu g \times h/L$)	$2,4 \times 10^{-03}$	$5,2 \times 10^{-03}$
$t_{1/2 \lambda_z}$ (h)	$4,7 \times 10^{-04}$		$AUC_{0-\infty}$ ($\mu g \times h/L$)	$3,5 \times 10^{-04}$	$1,4 \times 10^{-03}$
k_a (1/h)		$3,3 \times 10^{-03}$	MRT (h)	$3,5 \times 10^{-04}$	
$t_{1/2 k_a}$ (h)		$3,3 \times 10^{-03}$	MAT (h)		$2,7 \times 10^{-03}$
C_{max} ($\mu g/L$)		0,35	F (%)		0,11
T_{max} (h)		$1,3 \times 10^{-03}$			

$P < 0,05$: diferencias significativas; $P > 0,05$: diferencias no significativas,

Tabla 18.- Estudio comparativo no paramétrico (H de Kruskal-Wallis) entre los principales parámetros farmacocinéticos compartimentales y no compartimentales obtenidos tras la administración de una dosis de 2 mg/kg de marbofloxacin por vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC), y tras la administración de una dosis de 6 mg/kg de marbofloxacin por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a cabras.

Como resultado de dicha prueba, se observan diferencias significativas y por tanto se rechaza la hipótesis nula, para todas las vías, en la semivida de eliminación de la fase terminal ($t_{1/2 \lambda_z}$), en la lambda Z (λ_z), en el tiempo medio de residencia (MRT) y en las áreas bajo la curva de concentración plasmática, tanto a las 24 horas (AUC_{0-24}) como a tiempo infinito ($AUC_{0-\infty}$). Así mismo, se ha realizado la comparación entre las tres administraciones por vía extravascular: SC, SC1 y SC2 y en este caso se rechaza la hipótesis nula en todos los casos salvo para la concentración plasmática máxima ($C_{máx}$) y en biodisponibilidad (F%), en las que se acepta la igualdad entre ellas.

En aquellos casos en los que se han encontrado diferencias significativas con la prueba de Kruskal-Wallis, se ha realizado una segunda prueba utilizando la T de Wilcoxon para datos pareados cuyos valores de P obtenidos se muestran en la tabla 19. Como en el caso anterior se rechaza la igualdad cuando $P < 0,05$.

Parámetros	P _{SC/IV}	P _{SC1/IV}	P _{SC2/IV}	P _{SC1/SC}	P _{SC2/SC}	P _{SC1/SC2}
λ_z (1/h)	0,160	0,035	0,035	0,036	0,036	0,100
$t_{1/2\lambda_z}$ (h)	0,220	0,036	0,036	0,035	0,036	0,140
k_a (1/h)				0,036	0,036	1,000
$t_{1/2k_a}$ (h)				0,036	0,036	1,000
T_{max} (h)				0,033	0,034	0,340
AUC ₀₋₂₄ ($\mu\text{g}\times\text{h/L}$)	0,210	0,036	0,036	0,036	0,036	0,036
AUC _{0-\infty} ($\mu\text{g}\times\text{h/L}$)	0,210	0,036	0,036	0,036	0,036	0,036
MRT (h)	0,036	0,036	0,035	0,036	0,036	0,530
MAT (h)				0,036	0,036	0,530

P<0,05: diferencias significativas; P>0,05: diferencias no significativas,

Tabla 19.- Estudio comparativo no paramétrico (T de Wilcoxon) entre los principales parámetros farmacocinéticos compartimentales y no compartimentales obtenidos tras la administración de una dosis de 2 mg/kg de marbofloxacino por vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC), y tras la administración de una dosis de 6 mg/kg de marbofloxacino por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a cabras.

La prueba de la suma de rangos de Wilcoxon evalúa la hipótesis de que los valores de cada parámetro, comparados entre dos vías de administración son iguales o diferentes. Como resultado de dicha prueba se presentan los siguientes resultados:

Comparación de las vías extravasculares respecto la vía intravenosa: para relación SC/IV no se observan diferencias significativas en ningún parámetro, a excepción del tiempo medio de residencia (MRT). Para las relaciones SC1/IV, y SC2/IV se observan diferencias significativas en todos los parámetros.

Comparación de las formulaciones extravasculares poliméricas con la formulación extravascular convencional: las relaciones SC1/SC y SC2/SC muestran diferencias significativas en todos los parámetros.

Comparación de las formulaciones extravasculares poliméricas entre sí: sólo se observan diferencias significativas en las áreas bajo la curva de concentración plasmática a las 24 horas (AUC₀₋₂₄) y a tiempo infinito (AUC_{0-\infty}).

Comparación de las formulaciones extravasculares poliméricas con la formulación extravascular convencional: las relaciones SC1/SC y SC2/SC muestran diferencias significativas en todos los parámetros.

Comparación de las formulaciones extravasculares poliméricas entre sí: sólo se observan diferencias significativas en las áreas bajo la curva de concentración plasmática a las 24 horas (AUC₀₋₂₄) y a tiempo infinito (AUC_{0-\infty}).

4.6.- EVALUACIÓN DE LA ABSORCIÓN *IN VIVO* DE MARBOFLOXACINO MEDIANTE DECONVOLUCIÓN.

Las curvas plasmáticas experimentales obtenidas tras las administraciones extravasculares de marbofloxacino en las formulaciones SC, SC1 y SC2, fueron sometidas a un proceso de deconvolución numérica. Para llevar a cabo dicha práctica, se utilizaron los valores de los coeficientes y exponentes obtenidos tras el ajuste compartimental de las curvas plasmáticas de marbofloxacino tras la administración intravenosa. A partir de dichos parámetros se determinó la función UIR o *unit impulse response* que permite evaluar la tasa de absorción del fármaco para cada formulación, y estimar la cantidad del mismo que accede al compartimento central desde el depósito o zona de absorción (*WinNonlin 5,3 User's Guide 262-299*).

Tras el modelado de las curvas plasmáticas extravasculares se ha obtenido para cada animal y dosis, la velocidad de absorción en función del tiempo (mg/h) y la fracción de dosis absorbida, expresada como la cantidad absorbida respecto a la cantidad administrada, que es otra forma equivalente de calcular la biodisponibilidad sistémica:

$$\text{Fracción absorbida} = \frac{\text{mg absorbidos}}{(\text{Dosis administrada} \cdot \text{Peso animal})}$$

Los resultados obtenidos para cada animal, dosis y formulación se muestran en la tabla 20 y en los gráficos 11 hasta 21, respectivamente.

Parámetros	SC (2mg/kg)	SC1 (6mg/kg)	SC2 (6mg/kg)
Tasa de absorción máxima (mg/h)	106,42 ± 38,76	63,41 ± 10,73	50,07 ± 13,87
Tiempo de tasa de absorción máxima (h)	0,48 ± 0,23	1,44 ± 0,76	1,92 ± 0,76
Cantidad total absorbida (mg)	133,92 ± 47,69	375,15 ± 92,83	276,35 ± 53,63
Fracción absorbida*	1,13 ± 0,25	1,03 ± 0,22	0,80 ± 0,17

* Equivale a la cantidad total absorbida normalizada a 2 mg/kg.

Tabla 20.- Parámetros descriptores de la absorción extravascular obtenidos tras deconvolución numérica para las formulaciones SC, SC1 y SC2 a 2, 6 y 6 mg/kg, respectivamente, En todos los casos se ha tomado referencia para cada animal las curvas plasmáticas obtenidas tras la administración intravenosa de amrbofloxacino a 2 mg/kg.

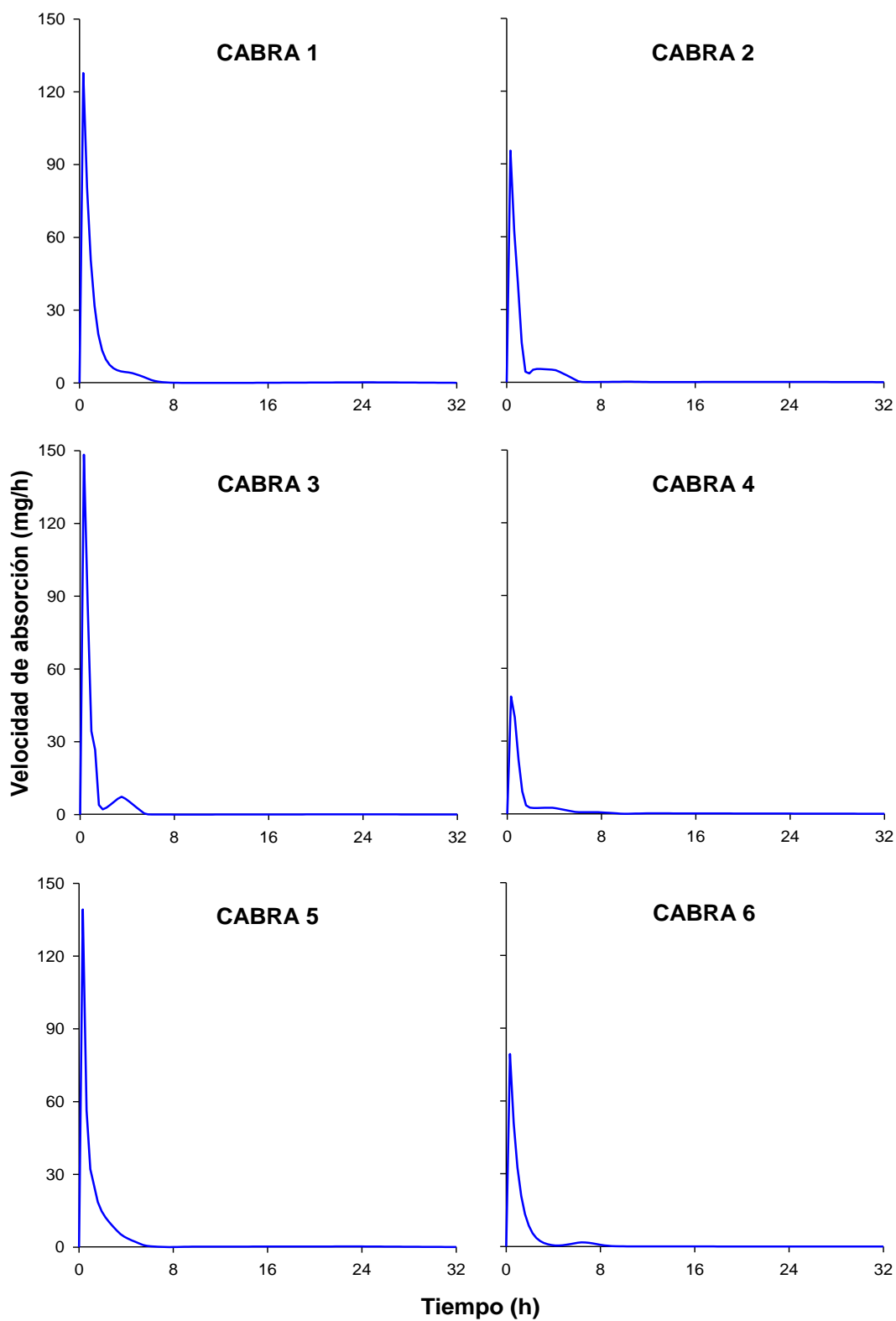


Gráfico 11.- Representación gráfica de las velocidades de absorción en función del tiempo calculadas mediante deconvolución numérica y obtenidas tras la administración subcutánea de marbofloxacino a una dosis de 2 mg/kg a cada cabra.

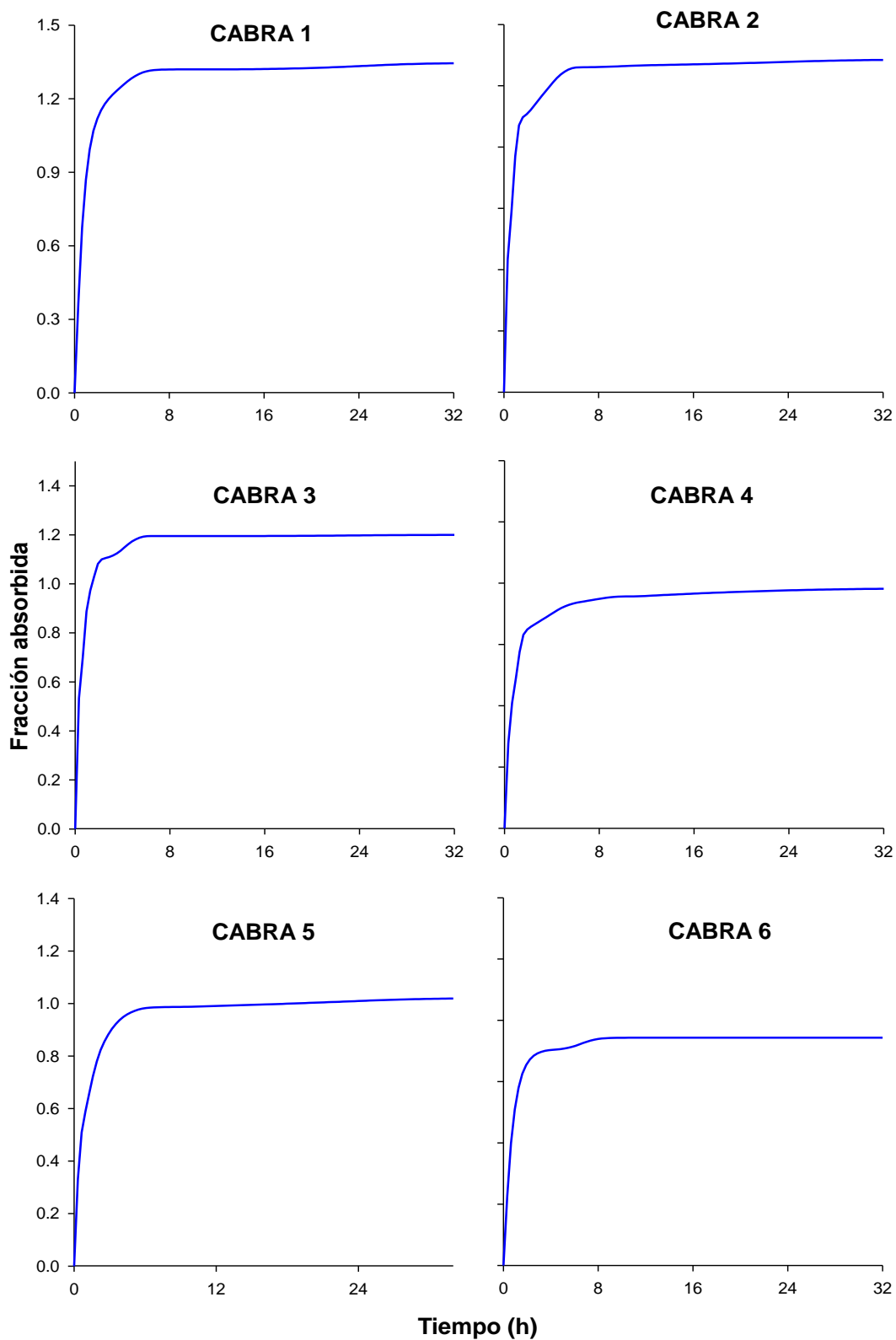


Gráfico 12.- Representación gráfica de la fracción absorbida en función del tiempo calculada mediante deconvolución numérica y obtenidas tras la administración subcutánea de marbofloxacino a una dosis de 2 mg/kg a cada cabra.

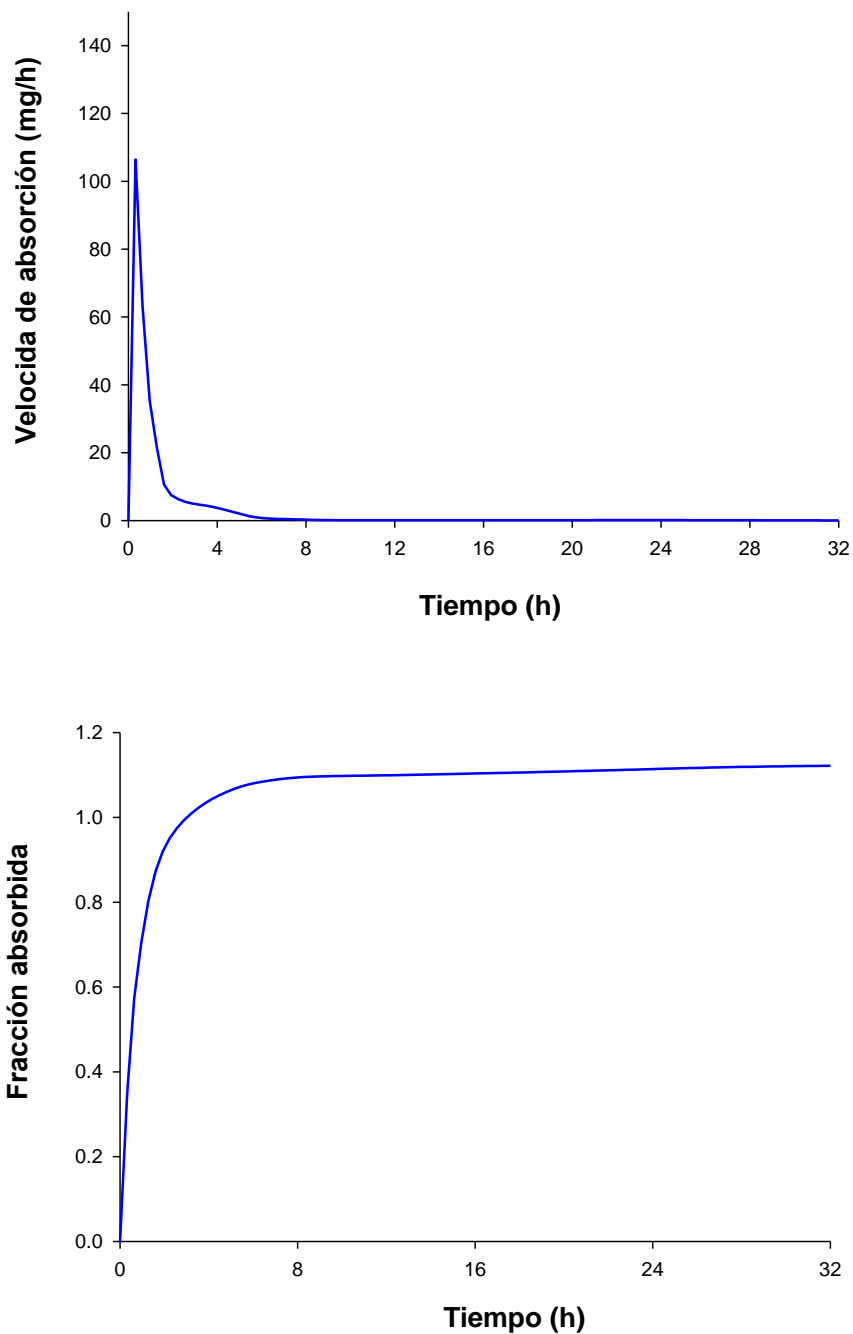


Gráfico 13.- Representación gráfica de la velocidad de absorción y la fracción absorbida promedio en función del tiempo calculada mediante deconvolución numérica y obtenidas tras la administración subcutánea de marbofloxacino a una dosis de 2 mg/kg.

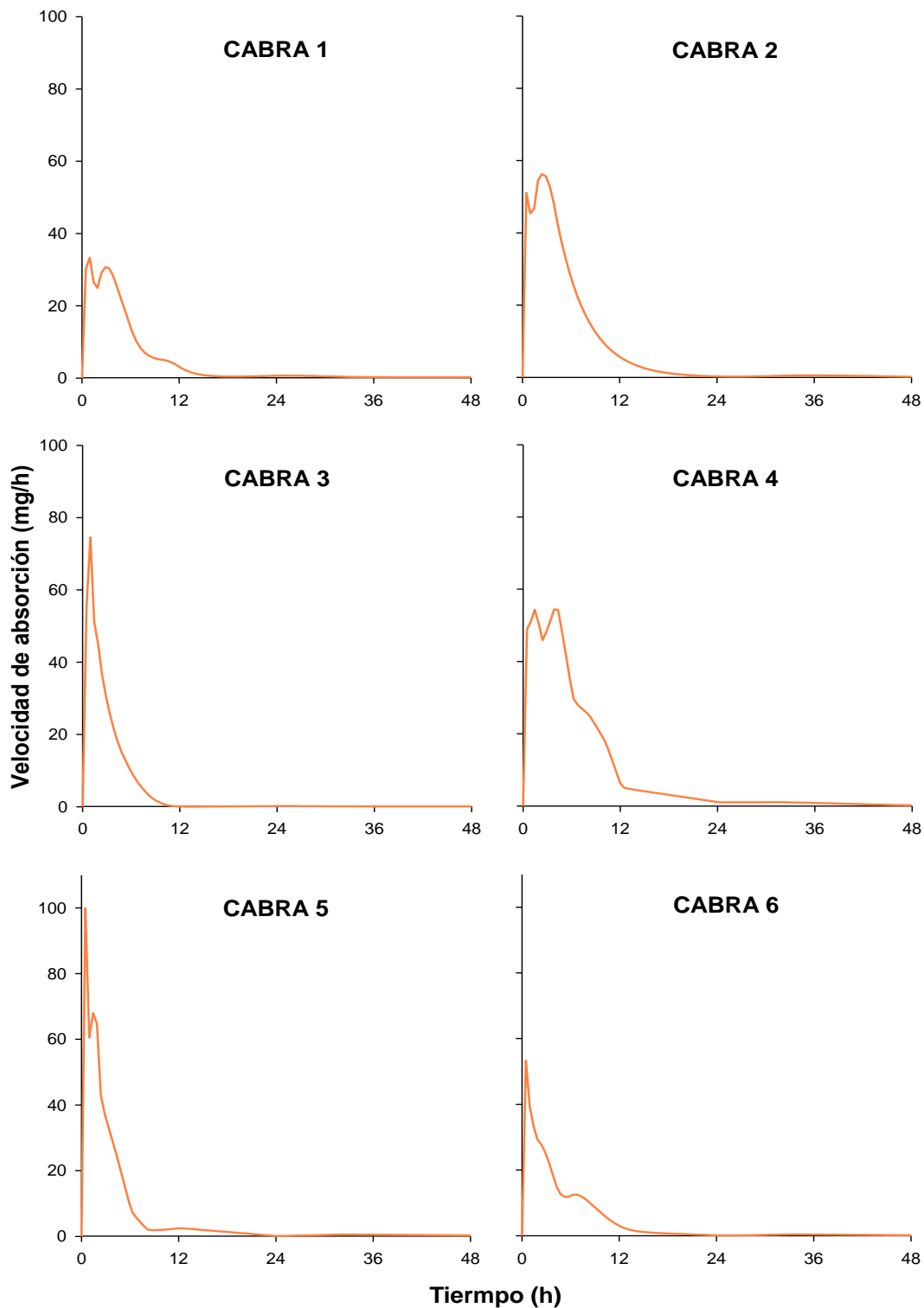


Gráfico 14.- Representación gráfica de las velocidades de absorción en función del tiempo calculadas mediante deconvolución numérica y obtenidas tras la administración subcutánea de la formulación SC1 de marbofloxacino a una dosis de 6 mg/kg a cada cabra.

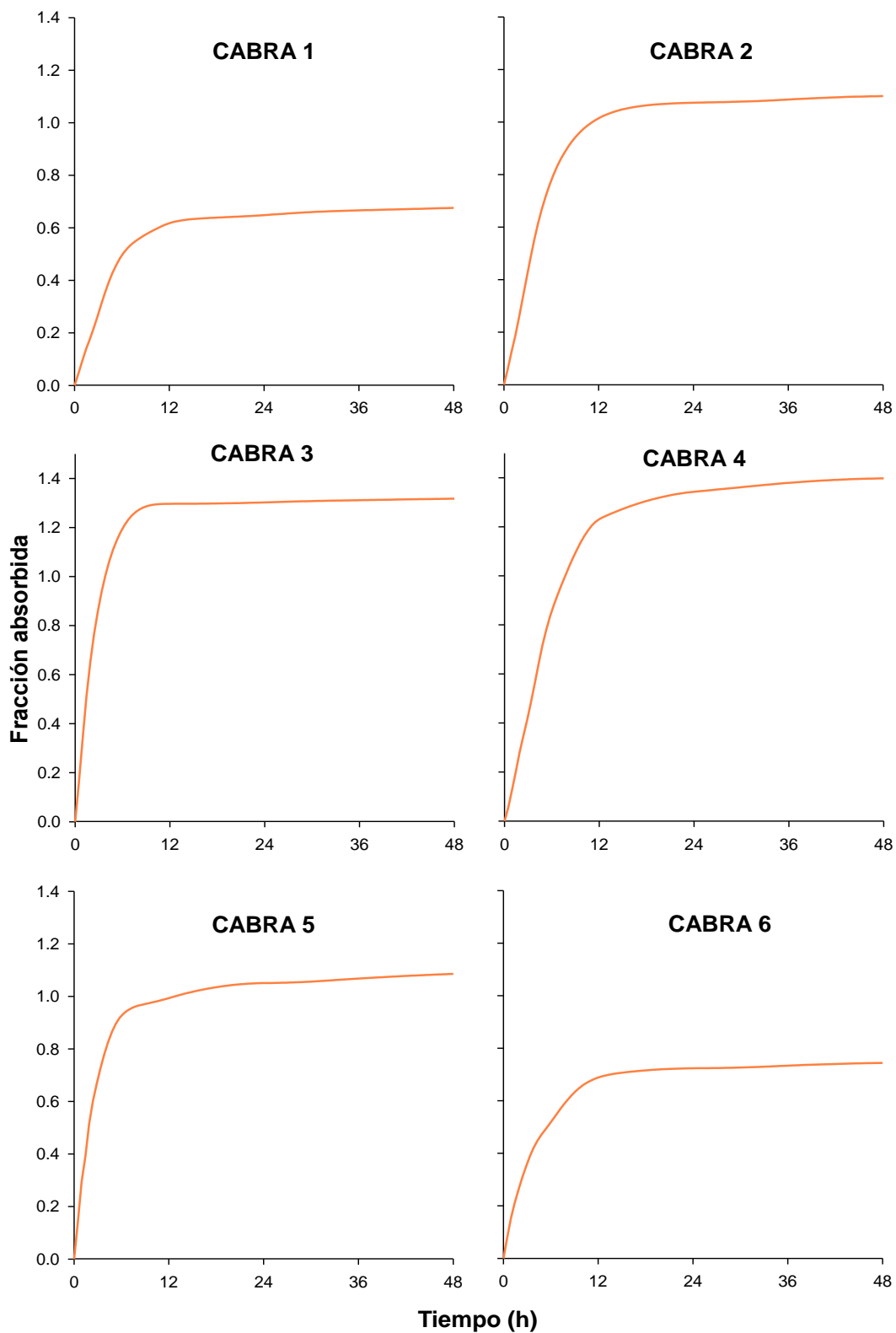


Gráfico 15.- Representación gráfica de la fracción absorbida en función del tiempo calculada mediante deconvolución numérica y obtenidas tras la administración subcutánea de la formulación SC1 de marbofloxacin a dosis de 6 mg/kg a cada cabra.

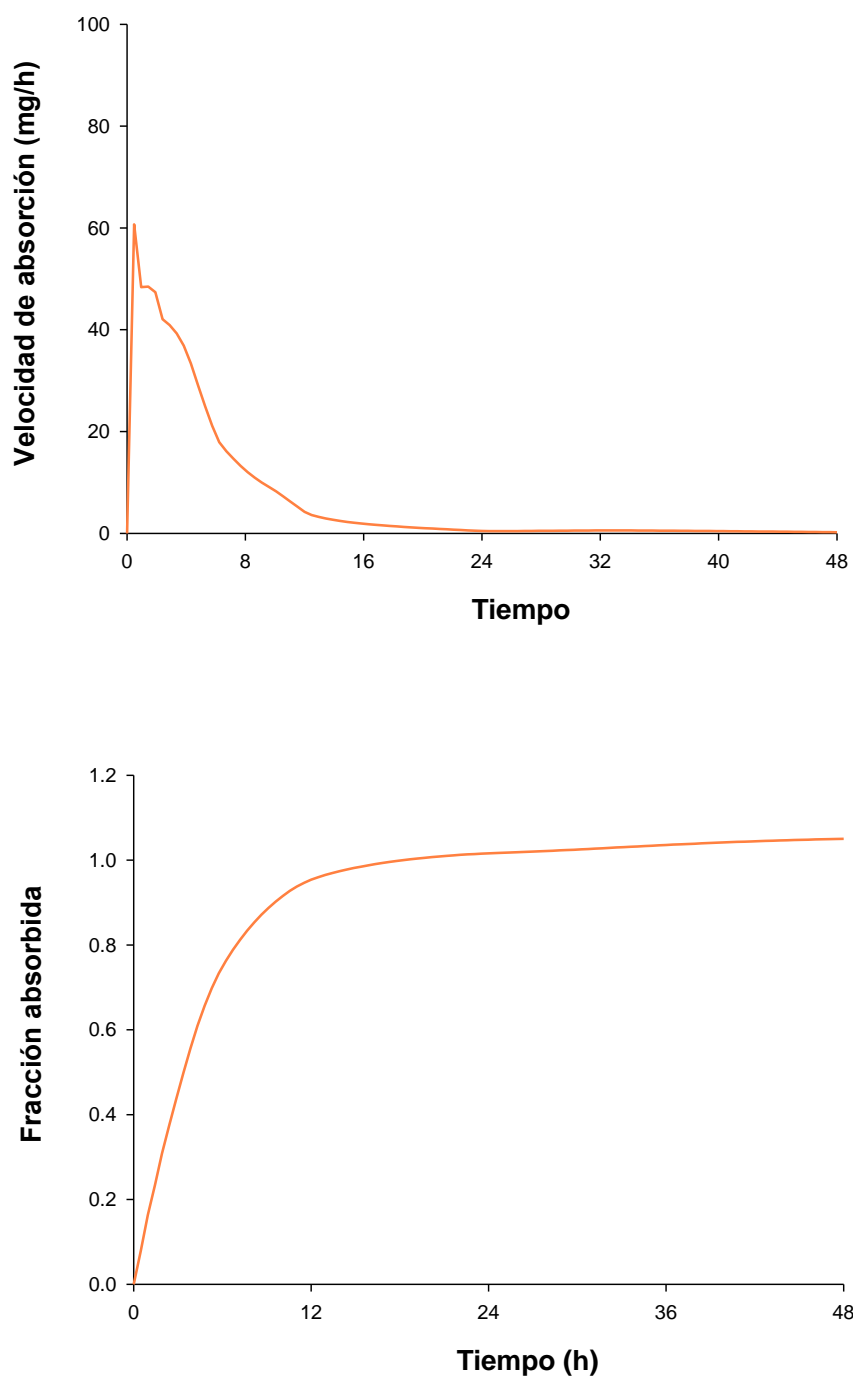


Gráfico 16.- Representación gráfica de la velocidad de absorción y la fracción absorbida promedio en función del tiempo calculada mediante deconvolución numérica y obtenidas tras la administración subcutánea de la formulación SC1 de marbofloxacino a una dosis de 6 mg/kg.

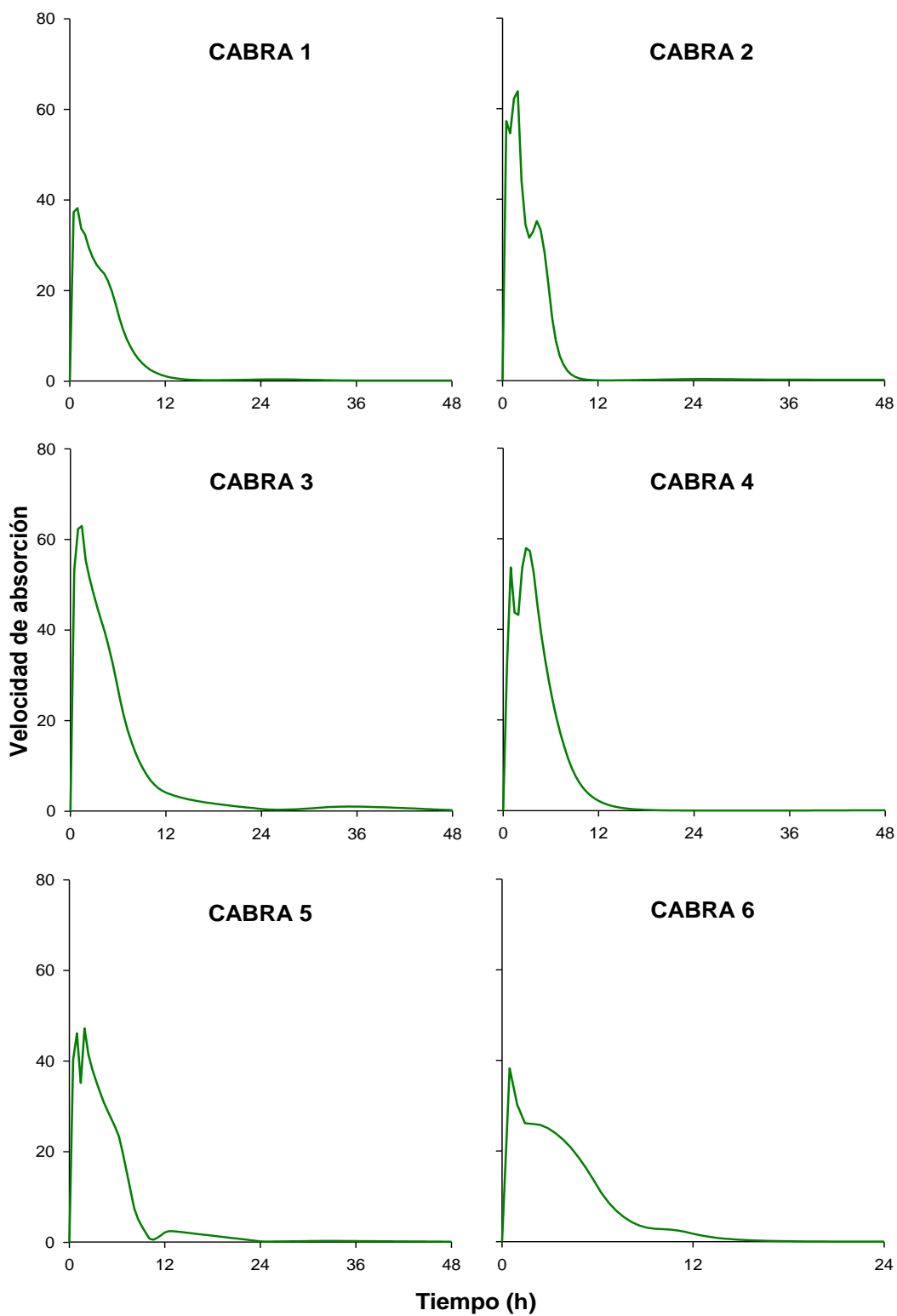


Gráfico 17.- Representación gráfica de las velocidades de absorción en función del tiempo calculadas mediante deconvolución numérica y obtenidas tras la administración subcutánea de la formulación SC2 de marbofloxacino a una dosis de 6 mg/kg a cada cabra.

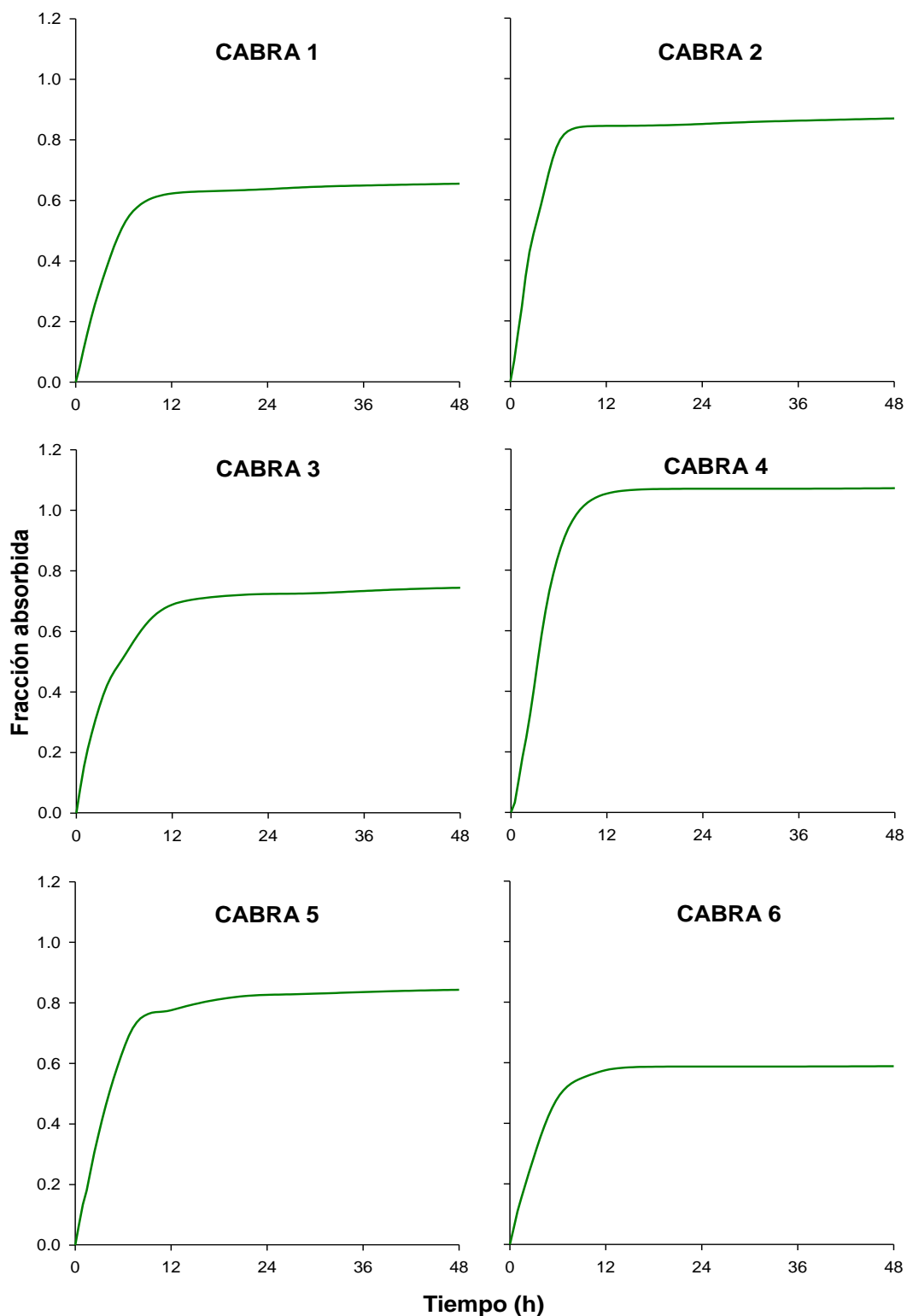


Gráfico 18.- Representación gráfica de la fracción absorbida en función del tiempo calculada mediante deconvolución numérica y obtenidas tras la administración subcutánea de la formulación SC2 de marbofloxacino a una dosis de 6 mg/kg a cada cabra.

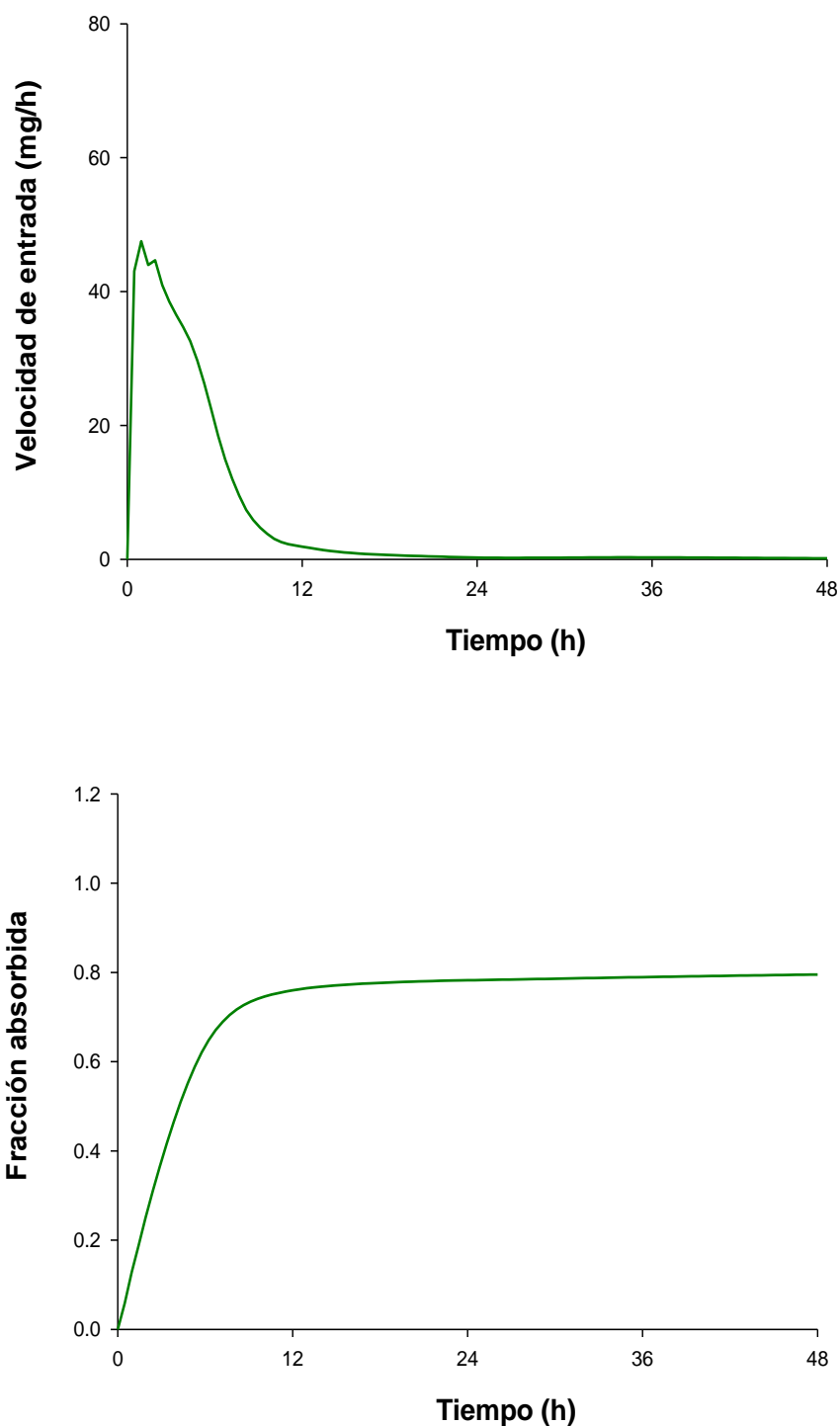


Gráfico 19.- Representación gráfica de la velocidad de absorción y la fracción absorbida promedio en función del tiempo calculada mediante deconvolución numérica y obtenidas tras la administración subcutánea de la formulación SC2 de marbofloxacino a una dosis de 6 mg/kg.

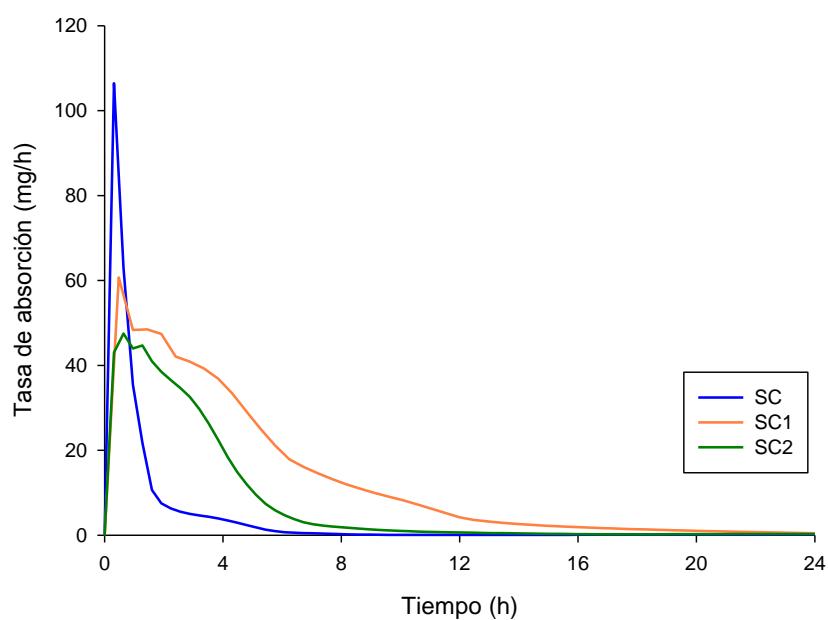
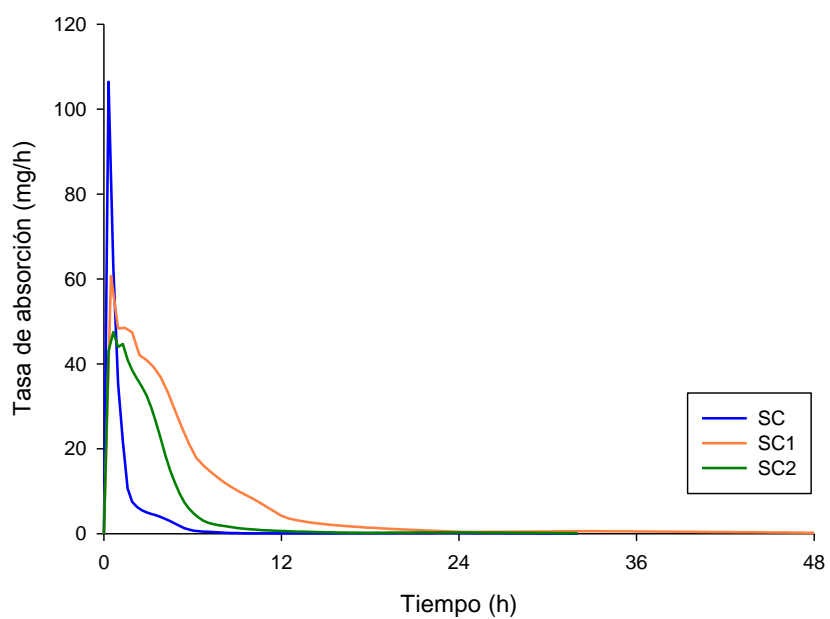


Gráfico 20.- Representación gráfica de las velocidades de absorción promedio en función del tiempo calculadas mediante deconvolución numérica y obtenidas tras la administración subcutánea de la formulación convencional (SC) de marbofloxacino a una dosis de 2 mg/kg y tras las formulaciones poliméricas de poloxamer (SC1 y SC2) a 6 mg/kg. La figura superior equivale a las 48 horas tras la administración, y la inferior a las 24 horas tras la administración.

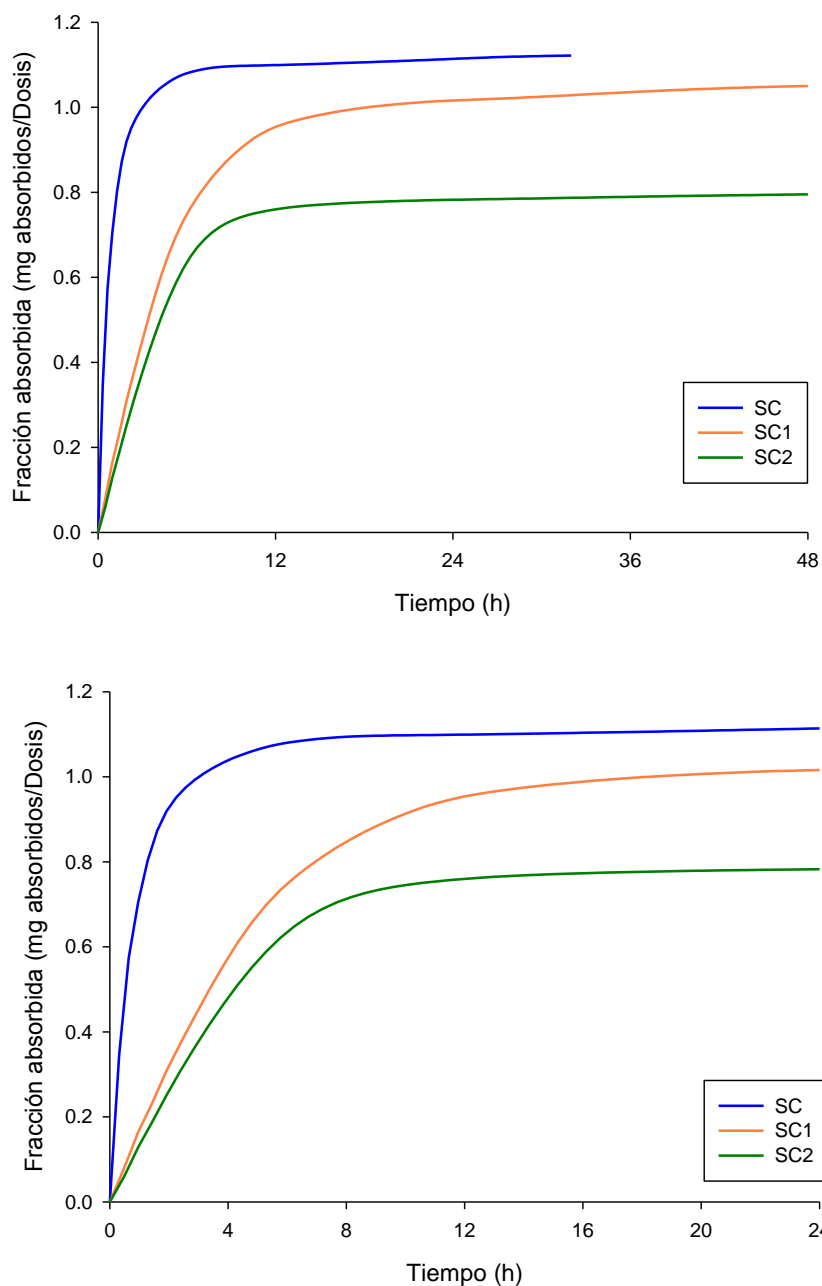


Gráfico 21.- Representación gráfica de las fracciones absorbidas promedio en función del tiempo calculadas mediante deconvolución numérica y obtenidas tras la administración subcutánea de la formulación convencional (SC) de marbofloxacino a una dosis de 2 mg/kg y tras las formulaciones poliméricas de poloxamer (SC1 y SC2) a 6 mg/kg. La figura superior equivale a las 48 horas tras la administración y la inferior a las 24 horas tras la administración.

4.7.- EXCRECIÓN A TRAVÉS DE LA LECHE DE MARBOFLOXACINO: ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA.

Las concentraciones experimentales de marbofloxacino, obtenidas en la leche de los animales tratados con una dosis intravenosa de 2 mg/kg de peso, se muestran en la Tabla 21. Como se puede observar, las concentraciones del fármaco son detectables hasta las 48 horas, si bien, en la cabra 2 se puede detectar dicho fármaco hasta las 24 horas, y en la cabra 3 hasta las 32 horas. Este hecho se refleja en el Gráfico 22 de las representaciones semilogarítmicas de las concentraciones correspondientes a cada animal. En el gráfico 23 se representan los valores de concentración promediados en escala semilogarítmica.

Tiempo	Concentración excretada en leche para los animales sometidos a estudio (cabras)								
	1	2	3	4	5	6	Media	S.D.	C.V.
1	2027,98	126,87	660,18	662,76	1857,04	1782,40	1186,20	798,37	67,30
2	2674,64	154,03	1101,23	683,51	1707,75	1180,40	1250,26	870,42	69,62
4	1473,70	83,64	885,63	706,93	1054,17	1236,59	906,78	483,70	53,34
6	698,28	41,55	374,51	305,04	460,41	541,69	403,58	223,95	55,49
8	258,40	13,64	170,27	124,43	179,21	181,70	154,61	81,41	52,66
10	161,80	7,45	77,76	64,29	88,09	94,86	82,38	49,92	60,59
12	94,33	4,45	55,17	46,06	56,77	45,19	50,33	28,81	57,24
24	13,60	2,45	8,89	8,56	19,23	13,70	11,07	5,75	51,91
32	6,74		2,06	5,10	10,30	6,96	6,23	3,00	48,16
48	2,50			2,01	4,97	3,96	3,36	1,36	40,39

TABLA 21.- Concentraciones experimentales de marbofloxacino excretadas en leche, expresadas en µg/L, en cada cabra tras la administración intravenosa de una dosis de 2 mg/kg junto con sus estadísticos asociados.

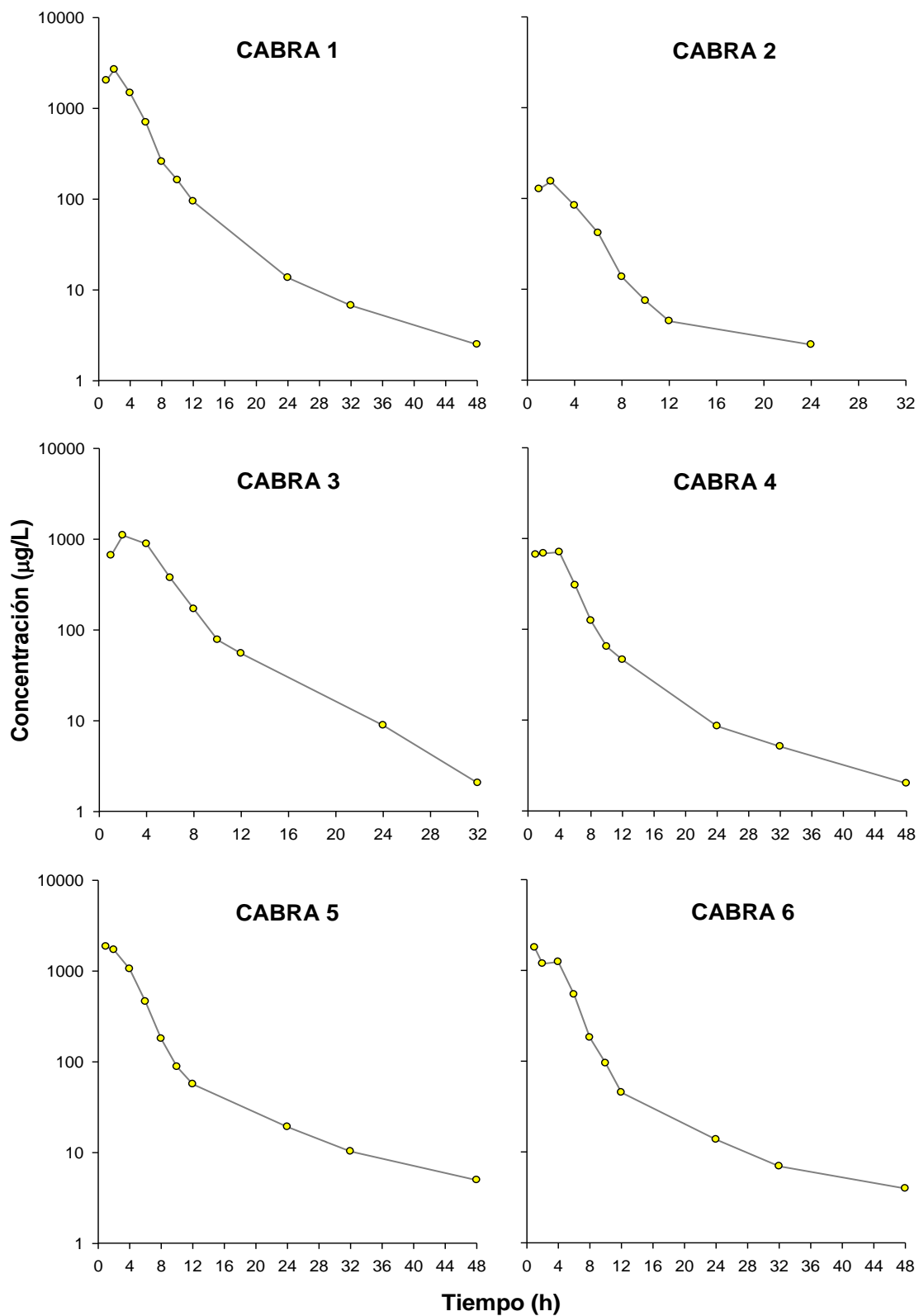


Gráfico 22.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones experimentales de marbofloxacin obtenidas en leche tras la administración de una dosis de 2 mg/kg vía intravenosa.

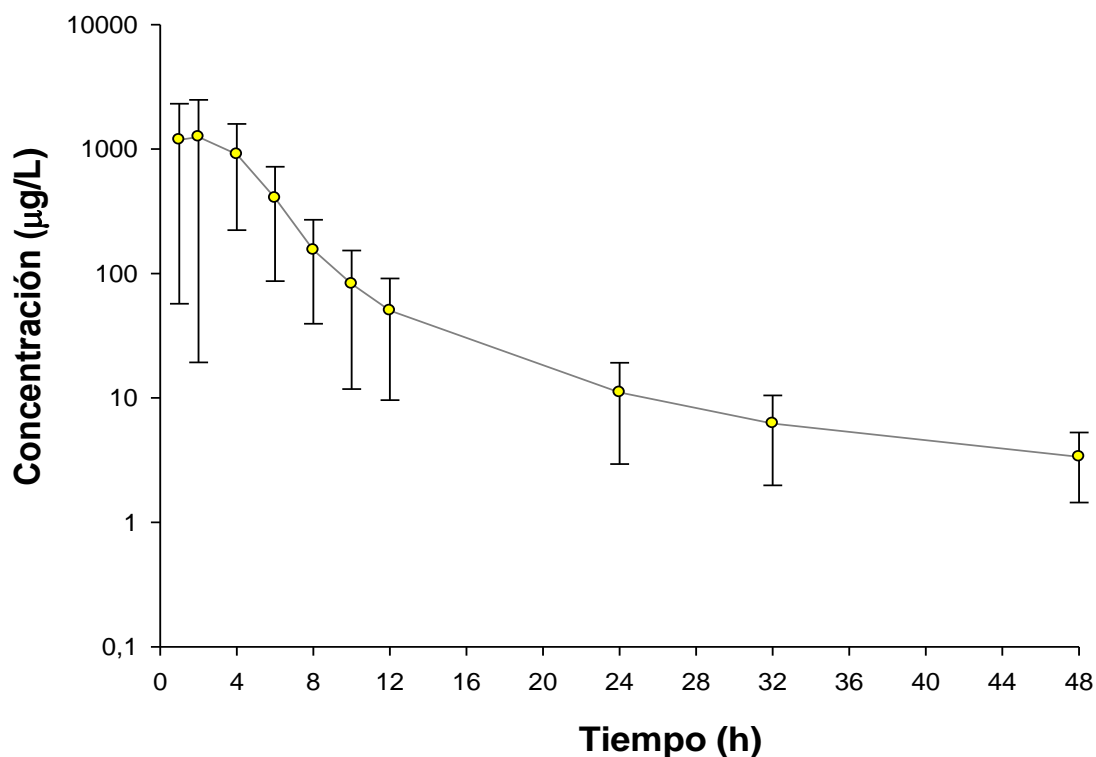


Gráfico 23.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de marbofloxacino excretadas en leche tras la administración de una dosis de 2 mg/kg vía intravenosa (IV) en cabras.

Para estudiar la homogeneidad de los datos se ha realizado el test de Kruskal-Wallis al igual que en las determinaciones de fármaco en plasma tras las administraciones anteriores y con las mismas premisas (Tabla 22).

Pruebas de Bondad de Ajuste para la Concentración		
Prueba de Kruskal-Wallis para Concentración por Animales	Valor-P*	0,222
Prueba de Kruskal-Wallis para Concentración por Tiempo	Valor-P*	$2,839 \times 10^{-7}$

* Se compara con un valor de probabilidad de 0,05 para un 95% de nivel de confianza,

Tabla 22.- Test estadístico de Kruskal-Wallis para las concentraciones plasmáticas de marbofloxacino excretadas en leche, tras la administración de una dosis intravenosa de 2 mg/kg a cabras.

En la Tabla 23, se muestran las cantidades de marbofloxacino, en microgramos, excretadas en leche para cada animal, para los diferentes tiempos de ordeño, tras la administración intravenosa de 2 mg/kg de peso, junto con los estadísticos de desviación correspondientes.

Tiempo	Cantidad excretada en leche para los animales sometidos a estudio (cabras)								
	1	2	3	4	5	6	Media	S.D.	C.V.
1	1642,66	69,78	180,89	384,40	739,10	1005,27	670,35	590,65	88,11
2	497,48	11,09	52,86	84,75	68,31	70,82	130,89	181,38	138,57
4	327,16	9,03	85,02	87,66	25,30	150,86	114,17	115,94	101,55
6	244,40	11,22	44,94	73,21	78,27	200,43	108,74	92,28	84,86
8	41,34	3,96	9,19	27,87	10,39	17,81	18,43	13,96	75,74
10	33,98	0,97	5,75	6,81	13,92	23,72	14,19	12,51	88,16
12	22,64	0,71	4,14	2,76	2,27	9,04	6,93	8,21	118,47
24	26,66	3,85	5,78	10,70	17,04	24,46	14,75	9,56	64,83
32	7,01		1,03	5,15	6,39	7,45	5,40	2,59	47,99
48	4,38			4,01	4,97	8,32	5,42	1,97	36,36

Tabla 23.- Cantidad de marbofloxacino excretada en leche, en microgramos, en cada cabra tras la administración intravenosa de una dosis de 2 mg/kg junto con sus estadísticos de desviación.

Los valores de concentración en leche obtenidos para cada cabra han sido sometidos a análisis no compartimental. En la Tabla 24 aparecen los parámetros calculados junto con sus valores medios y estadísticos de desviación. También se muestran los ratios AUC_{leche}/AUC_{plasma} , $C_{m\acute{a}x-leche}/C_{m\acute{a}x-plasma}$ obtenidos a partir de parámetros farmacocinéticos no compartimentales, así como el porcentaje de excreción en leche que se calcula según la siguiente expresión:

$$\% \text{ excreción} = 100 \cdot \frac{\text{cantidad excretada en leche}}{\text{Dosis} \cdot \text{Peso del animal}}$$

Parámetros	Animales sometidos a estudio (cabras)								
	1	2	3	4	5	6	Media	S.D.	C.V.
$C_{m\acute{a}x}$	2674,64	154,03	1101,23	1101,23	706,93	1782,40	1253,41	877,88	70,04
$T_{m\acute{a}x}$	2,00	2,00	2,00	2,00	4,00	1,00	2,17	0,98	45,38
AUC	12157,58	731,95	5824,41	5824,41	4608,05	8290,16	6239,43	3809,68	61,06
MRT	4,49	5,77	4,69	4,69	5,67	5,01	5,05	0,54	10,70
AUC_{leche}/AUC_{plasma}	1,31	0,09	0,91	1,00	0,58	1,30	0,86	0,47	54,07
$C_{m\acute{a}x-leche}/C_{m\acute{a}x-plasma}$	0,68	0,03	0,35	0,36	0,20	0,47	0,35	0,22	63,09
% excreción	2,69	0,11	0,29	0,67	0,85	1,56	1,03	0,96	93,44

TABLA 24.- Parámetros farmacocinéticos no compartimentales de la leche tras la administración intravenosa de marbofloxacino, a dosis de 2 mg/kg, a cada una de las cabras junto con sus valores medios y estadísticos de desviación.

En el Gráfico 24 se representa, en escala semilogarítmica, los valores individuales de las concentraciones de marbofloxacino, tras la administración intravenosa de una dosis de 2 mg/kg de marbofloxacino en plasma y en leche. En el gráfico 25 se representan sus respectivos valores medios (media \pm SD). En ellos puede observarse como las concentraciones en leche de marbofloxacino son superiores a las plasmáticas a partir de las 2 – 4 horas, y se mantienen durante un periodo de tiempo 25 – 48 horas. La excepción es la cabra 2 que presenta unos valores inferiores de concentración en todo el rango de tiempo.

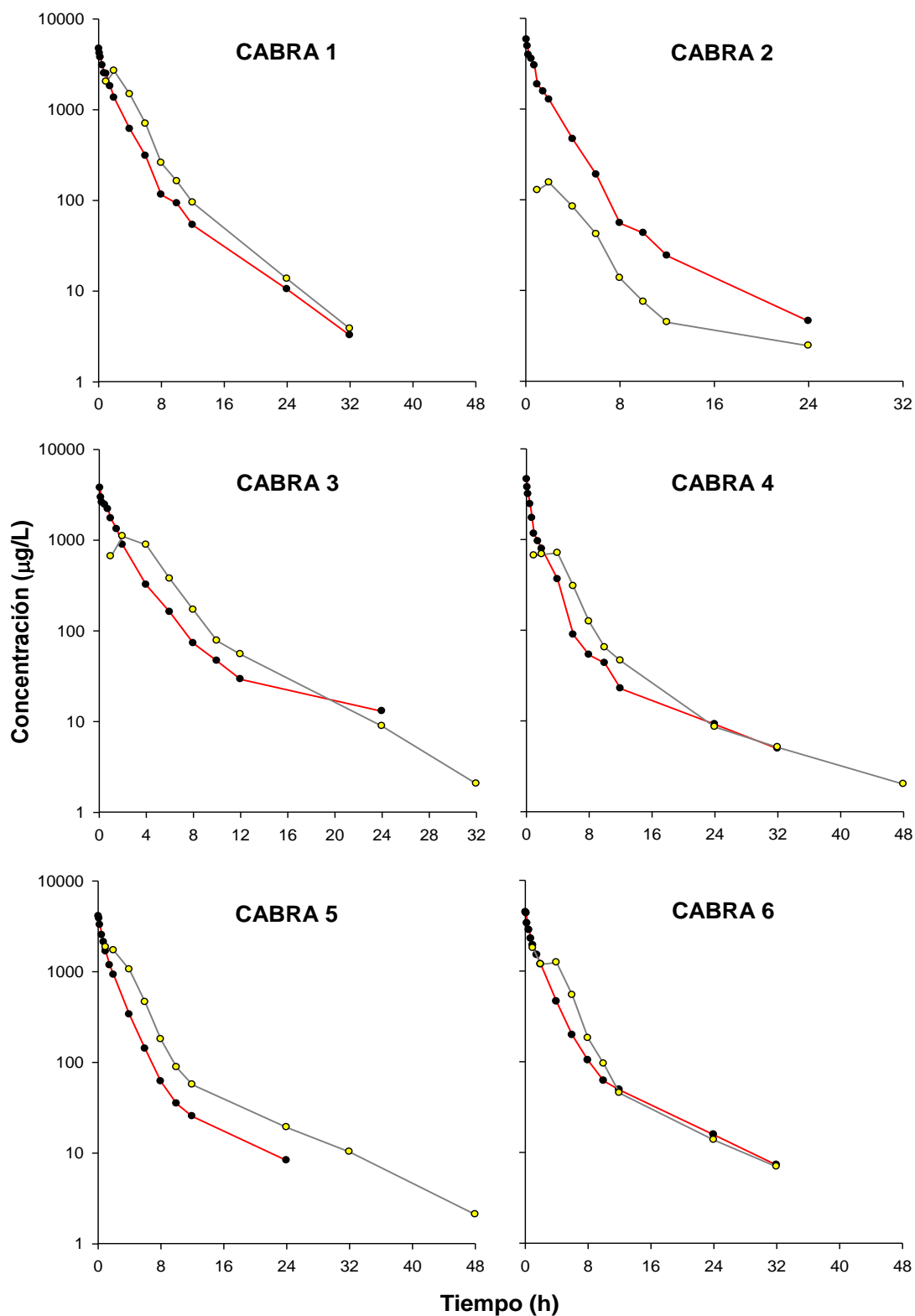


Gráfico 24.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones plasmáticas experimentales de marbofloxacin (*línea roja*), y las concentraciones experimentales detectadas en leche (*línea gris*), obtenidas tras la administración intravenosa de una dosis de 2 mg/kg a cada cabra por vía intravenosa.

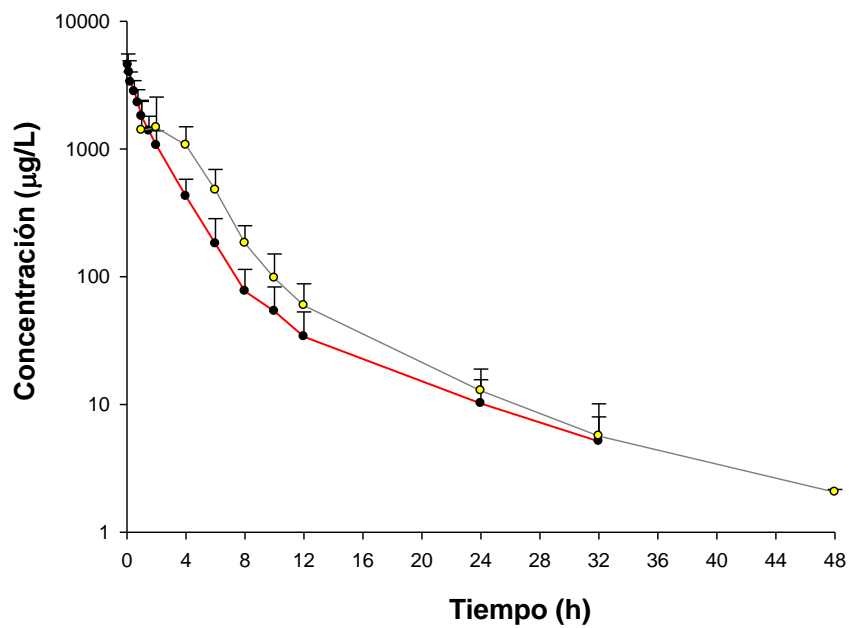


Gráfico 25.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de marbofloxacino obtenidas en plasma (*línea roja*), y en leche (*línea gris*), tras la administración intravenosa de una dosis de 2 mg/kg a cabras.

4.8.- EXCRECIÓN A TRAVÉS DE LA LECHE DE MARBOFLOXACINO: ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA.

En la Tabla 25 se muestran las concentraciones experimentales de marbofloxacino, obtenidas en la leche de los animales tratados con una dosis subcutánea de 2 mg/kg de peso junto con sus estadísticos correspondientes. Las concentraciones del fármaco en leche son detectables hasta las 48 horas, salvo en las cabras 2 y 4, en la que se detecta hasta 32 horas.

Tiempo	Concentración excretada en leche para los animales sometidos a estudio (cabras)								
	1	2	3	4	5	6	Media	S.D.	C.V.
1	1138,06	348,51	734,70	634,21	1624,25	588,64	844,73	460,85	54,56
2	2264,38	1552,65	1261,81	854,70	3143,21	1011,55	1681,39	871,95	51,86
4	1982,15	1117,31	1245,07	651,43	2170,33	1079,48	1374,30	582,30	42,37
6	1053,67	451,43	529,31	222,55	861,69	243,27	560,32	335,16	59,81
8	306,75	171,71	249,25	100,10	362,74	109,19	216,62	107,40	49,58
10	163,01	68,31	124,22	41,87	162,56	62,15	103,69	53,30	51,40
12	98,28	44,88	60,27	25,86	107,85	34,57	61,95	33,98	54,85
24	26,72	13,49	19,92	8,85	34,65	12,13	19,29	9,85	51,07
32	9,37	2,53	7,05	4,12	9,05	6,11	6,37	2,70	42,38
48	2,06		2,00		4,01	2,06	2,53	0,98	38,88

Tabla 25.- Concentraciones experimentales de marbofloxacino excretadas en leche, expresadas en $\mu\text{g/L}$, en cada cabra tras la administración subcutánea de una dosis de 2 mg/kg junto con sus estadísticos asociados.

Para comprobar la homogeneidad de los datos, se realiza un análisis de la varianza no paramétrico (test de Kruskal-Wallis) como en los análisis anteriores (Tabla 26).

Pruebas de Bondad de Ajuste para la Concentración		
Prueba de Kruskal-Wallis para Concentración por Animales	Valor-P*	0,8110
Prueba de Kruskal-Wallis para Concentración por Tiempo	Valor-P*	$2,006 \times 10^{-7}$

*Se compara con un valor de probabilidad de 0,05 para un 95% de nivel de confianza

Tabla 26.- Test estadístico de Kruskal-Wallis para las concentraciones plasmáticas de marbofloxacino excretadas en leche, tras la administración de una dosis subcutánea de 2 mg/kg a cabras.

Los gráficos 26 y 27 representan, en escala semilogarítmica, las concentraciones determinadas en leche para cada cabra, y el valor promedio calculado (\pm S.D.) respectivamente.

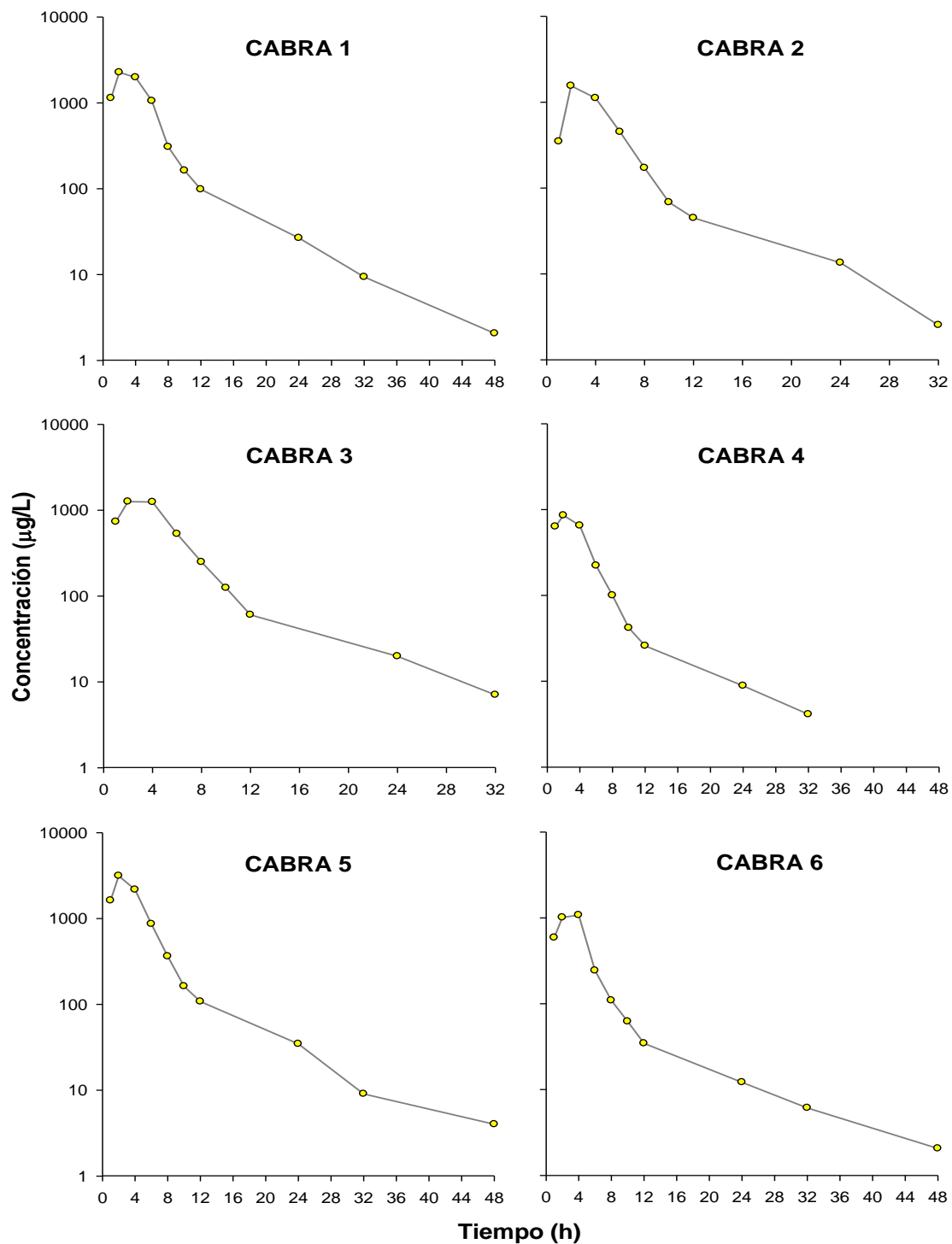


Gráfico 26.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones experimentales de marbofloxacin obtenidas en leche tras la administración de una dosis de 2 mg/kg vía subcutánea.

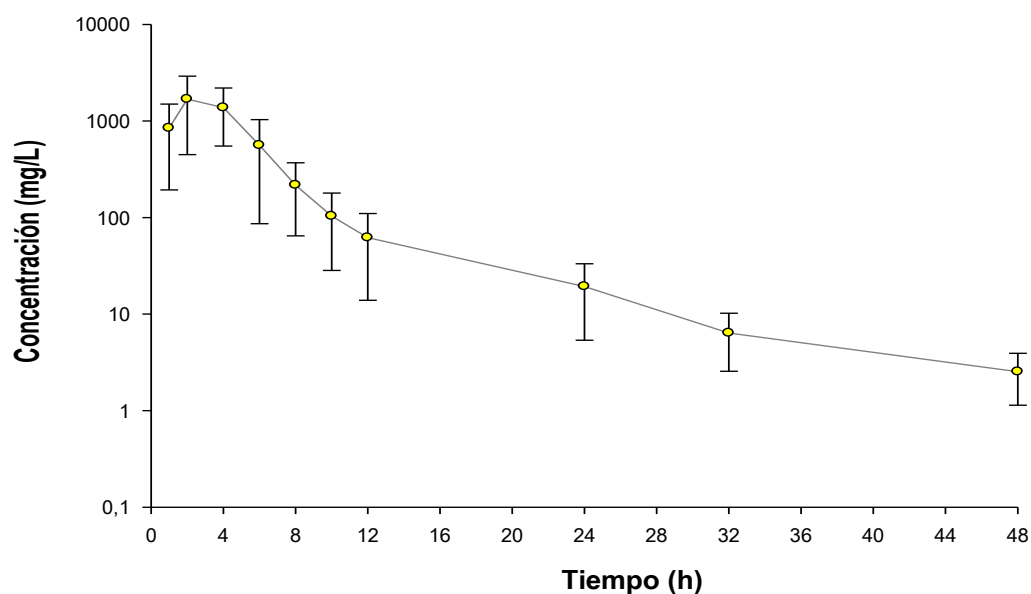


Gráfico 27.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de marbofloxacino excretadas en leche tras la administración de una dosis de 2 mg/kg vía subcutánea (SC) en cabras.

Las cantidades de marbofloxacino, en microgramos, excretadas en leche para cada animal y tiempo de ordeño, junto con los valores medios y sus estadísticos de desviación se reflejan en la Tabla 27.

Tiempo	Cantidad excretada en leche para los animales sometidos a estudio (cabras)								
	1	2	3	4	5	6	Media	S.D.	C.V.
1	459,78	20,21	98,45	374,19	474,28	400,28	304,53	195,06	64,05
2	117,75	9,32	37,85	12,82	47,15	119,36	57,38	49,53	86,33
4	416,25	147,48	80,93	61,89	156,26	174,88	172,95	127,22	73,56
6	263,42	117,37	79,40	60,09	129,25	104,61	125,69	72,03	57,31
8	70,55	26,27	12,46	11,01	65,29	33,30	36,48	25,81	70,75
10	27,71	15,71	2,48	4,61	27,63	5,59	13,96	11,56	82,84
12	22,41	1,80	6,75	1,86	7,98	13,41	9,04	7,85	86,90
24	26,72	16,19	5,97	7,08	20,79	9,71	14,41	8,28	57,43
32	8,62	2,28	3,03	3,79	5,16	6,66	4,92	2,39	48,55
48	4,74		1,40		3,61	0,25	2,50	2,04	81,76

Tabla 27.- Cantidad de marbofloxacino excretada en leche, en microgramos, en cada cabra tras la administración subcutánea de una dosis de 2 mg/kg junto con sus valores medios y estadísticos de desviación.

Los parámetros farmacocinéticos no compartimentales en leche se recogen en la tabla 28 y son los mismos que los utilizados en la vía intravenosa. Se han calculado de la misma manera y se exponen la concentración máxima de fármaco en leche ($C_{m\acute{a}x}$) y el tiempo en el que se alcanza dicha concentración ($T_{m\acute{a}x}$), el área bajo la curva de concentración en leche-tiempo (AUC) a las 24 horas y a tiempo infinito, y el tiempo medio de residencia (MRT). Además, en la citada tabla se muestran los ratios AUC_{leche}/AUC_{plasma} , $C_{m\acute{a}x-leche}/C_{m\acute{a}x-plasma}$ obtenidos y el porcentaje de excreción en leche.

Parámetros	Animales sometidos a estudio (cabras)								
	1	2	3	4	5	6	Media	S.D.	C.V.
$C_{m\acute{a}x}$	2264,38	1552,65	1261,81	854,70	3143,21	1079,48	1692,71	861,90	50,92
$T_{m\acute{a}x}$	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	4,00	2,33	0,82	34,99
AUC	12258,35	6415,25	7447,10	4144,75	14269,59	5316,88	8308,65	4043,49	48,67
MRT	5,23	4,87	5,59	4,85	5,10	5,32	5,16	0,28	5,50
AUC_{leche}/AUC_{plasma}	0,99	0,69	0,80	0,99	1,56	0,79	0,97	0,31	32,29
$C_{m\acute{a}x-leche}/C_{m\acute{a}x-plasma}$	0,82	0,59	0,47	0,82	1,51	0,62	0,81	0,37	46,05
% excreción	1,34	0,34	0,24	0,25	0,83	0,88	0,64	0,44	68,61

Tabla 28.- Parámetros farmacocinéticos no compartimentales de la leche tras la administración subcutánea de marbofloxacino, a dosis de 2 mg/kg, a cada una de las cabras junto con sus estadísticos de desviación.

En el Gráfico 28 se representa, en escala semilogarítmica, las concentraciones experimentales detectadas en plasma y en leche, para cada cabra, tras la administración subcutánea de una dosis de 2 mg/kg de marbofloxacino. En el gráfico 29 se representan sus respectivos valores promediados (media \pm SD).

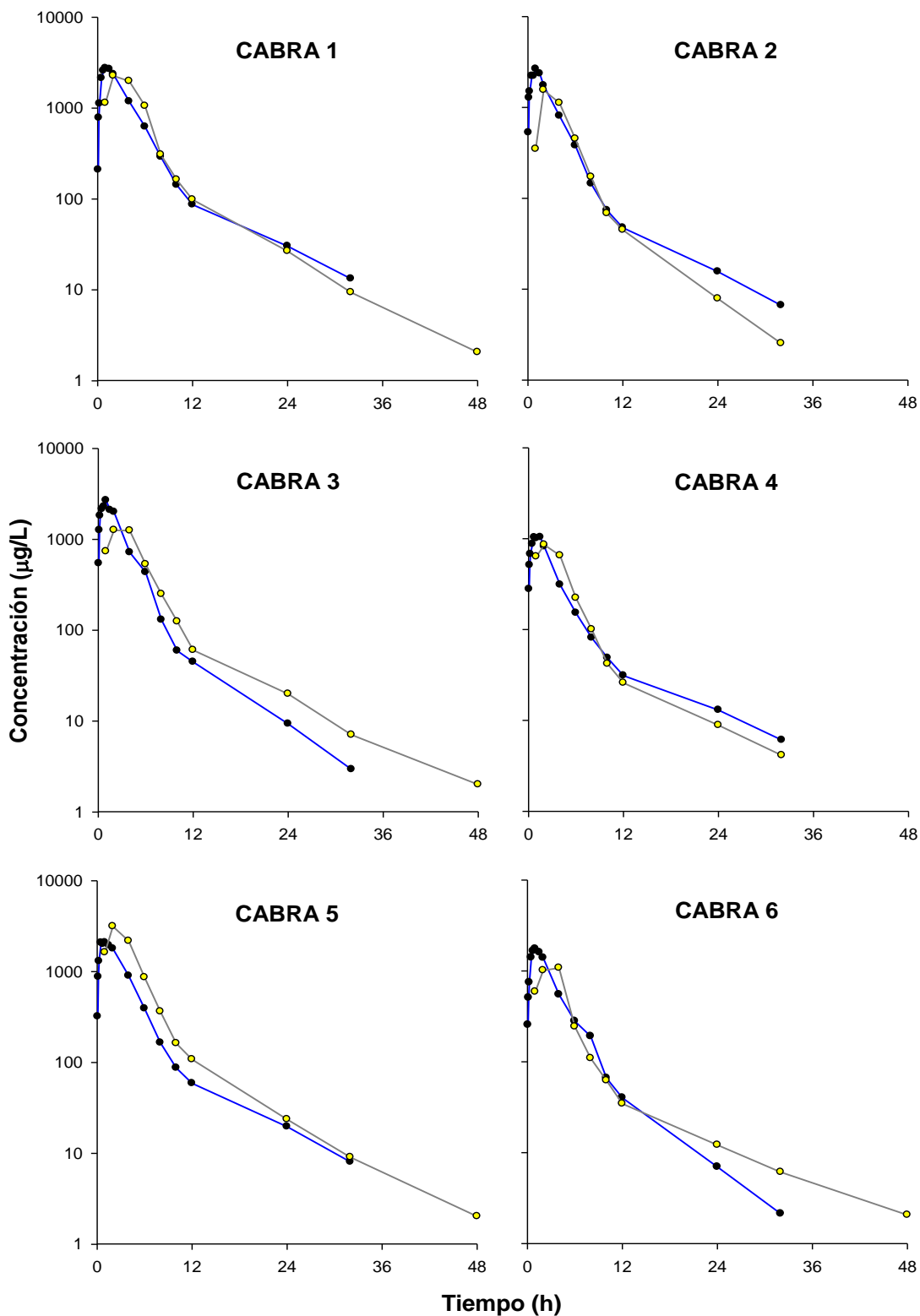


Gráfico 28.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones plasmáticas experimentales de marbofloxacin (*línea azul*), y las concentraciones experimentales detectadas en leche (*línea gris*), obtenidas tras la administración intravenosa de una dosis de 2 mg/kg a cada cabra por vía intravenosa.

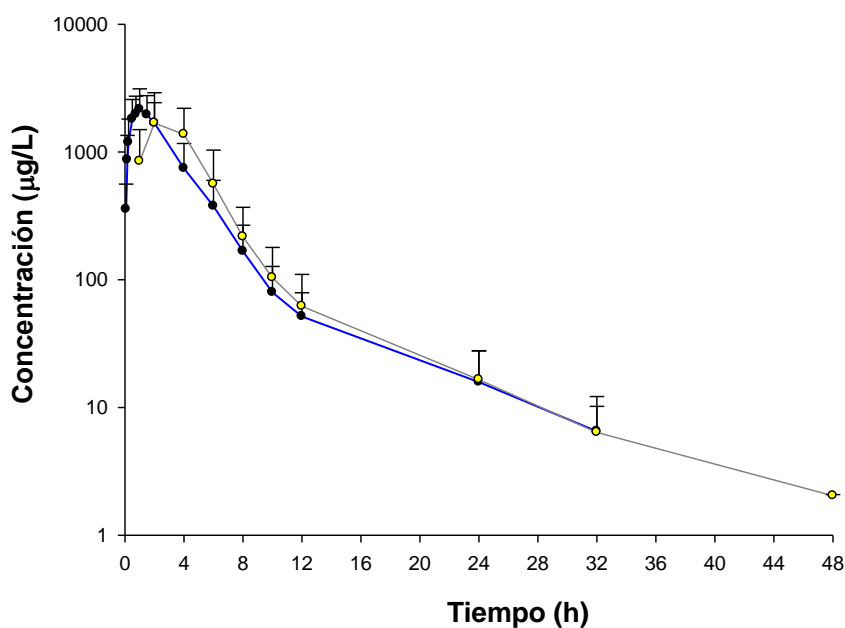


Gráfico 29.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de marbofloxacino obtenidas en plasma (*línea azul*), y en leche (*línea gris*), tras la administración intravenosa de una dosis de 2 mg/kg a cabras.

Como podemos observar en el Gráfico 28, las concentraciones de marbofloxacino en leche están muy equilibradas con las plasmáticas. Si bien se observan pequeñas diferencias entre animales, desde un punto de vista global las concentraciones en leche de las primeras horas son inferiores a las plasmáticas pero, prácticamente, desde las 2-4 horas las superan y se mantienen así hasta las 32-48 horas en todas las cabras. Esta tendencia general, observable en el gráfico 29 de los valores promediados, nos indica que los niveles en leche son ligeramente superiores a los plasmáticos desde las 2 horas hasta las 24 horas.

4.9.- EXCRECIÓN A TRAVÉS DE LA LECHE DE MARBOFLOXACINO: ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA DE SOLUCIÓN DEL POLÍMERO P407 AL 25%.

Las concentraciones experimentales de marbofloxacino, obtenidas en leche de los animales tras una administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg de peso de marbofloxacino en solución del polímero P407 al 25%, se muestran en la Tabla 29 junto a sus valores medios y parámetros de dispersión.

Tiempo	Concentración excretada en leche para los animales sometidos a estudio (cabras)								
	1	2	3	4	5	6	Media	S.D.	C.V.
1	341,28	385,63	272,71	359,51	955,82	438,41	458,89	249,44	54,36
2	2020,29	2641,59	2302,51	2289,74	1349,32	2194,57	2133,00	434,19	20,36
4	3630,30	3326,65	3680,04	3201,34	1462,80	2168,35	2911,58	896,07	30,78
6	2892,74	2041,92	4630,54	2760,59	1281,14	1477,15	2514,01	1224,90	48,72
8	2331,75	1263,89	2745,39	1745,91	926,12	642,61	1609,28	818,76	50,88
10	1486,41	663,33	1792,77	1081,79	764,24	384,66	1028,87	531,85	51,69
12	1018,94	339,12	1198,37	696,18	548,97	228,29	671,65	379,69	56,53
24	138,14	41,05	117,87	81,70	63,64	29,74	78,69	42,70	54,27
32	31,03	11,30	16,47	17,23	10,89	10,12	16,17	7,88	48,72
48	8,04	4,07	2,13	5,46	5,16	7,62	5,41	2,21	40,82

Tabla 29.- Concentraciones experimentales de marbofloxacino excretadas en leche, expresadas en $\mu\text{g/L}$, en cada cabra tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% junto con sus valores medios y estadísticos de desviación.

La homogeneidad de los datos se estudia mediante el test de Kruskal-Wallis (Tabla 30).

Pruebas de Bondad de Ajuste para la Concentración		
Prueba de Kruskal-Wallis para Concentración por Animales	Valor-P*	0,299
Prueba de Kruskal-Wallis para Concentración por Tiempo	Valor-P*	$11,134 \times 10^{-5}$

* Se compara con un valor de probabilidad de 0,05 para un 95% de nivel de confianza

Tabla 30.- Test de Kruskal-Wallis para las concentraciones plasmáticas de marbofloxacino excretadas en leche, tras la administración de una dosis subcutánea de de 6 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% a cabras.

Los gráficos 30 y 31 representan, en escala semilogarítmica, las concentraciones determinadas en leche para cada cabra, y el valor promedio calculado (\pm S.D.) respectivamente.

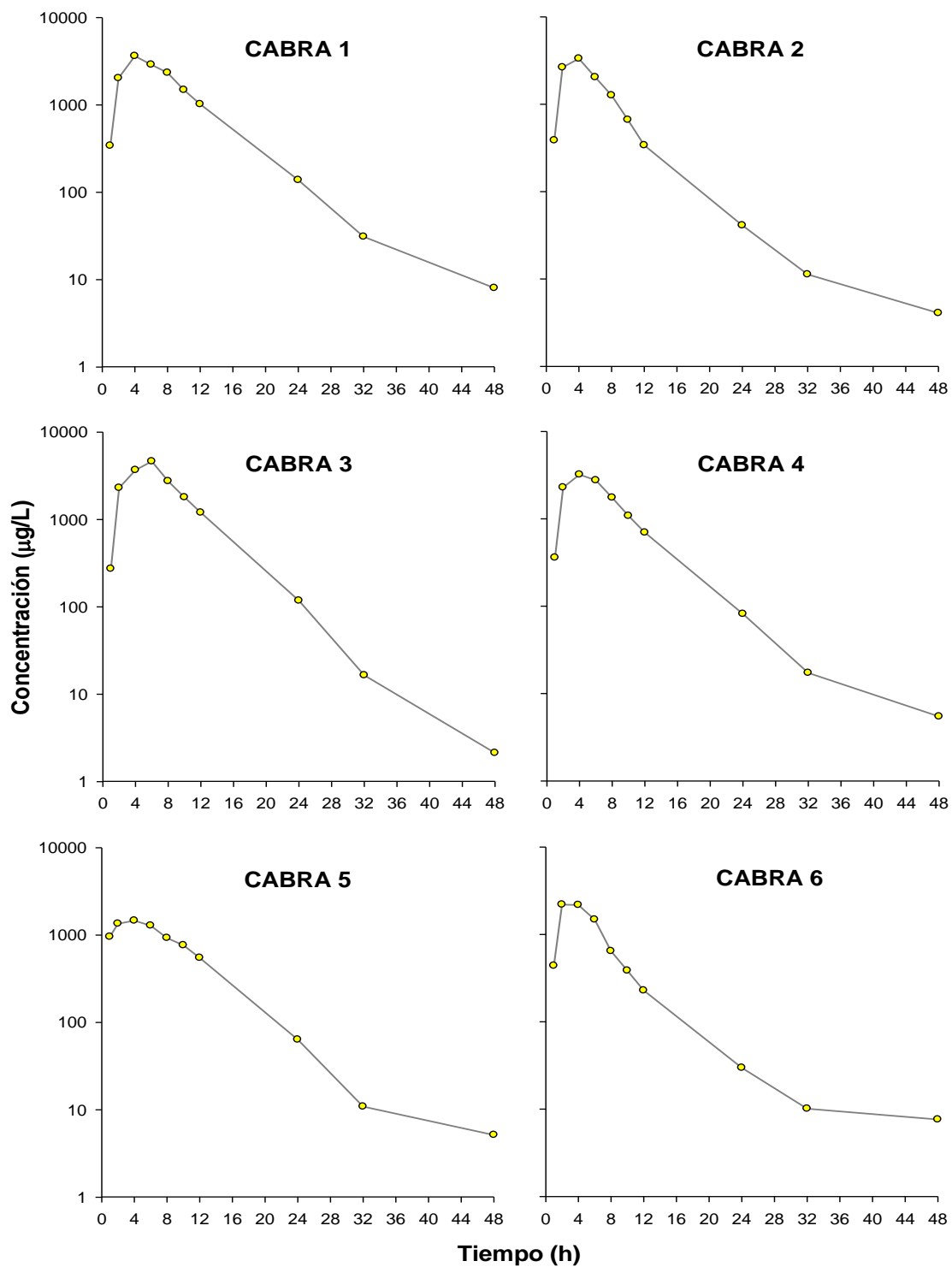


Gráfico 30.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones detectadas en leche, para cada cabra, tras la administración subcutánea de marbofloxacino en solución del polímero P407 al 25%, a la dosis de 6 mg/kg.

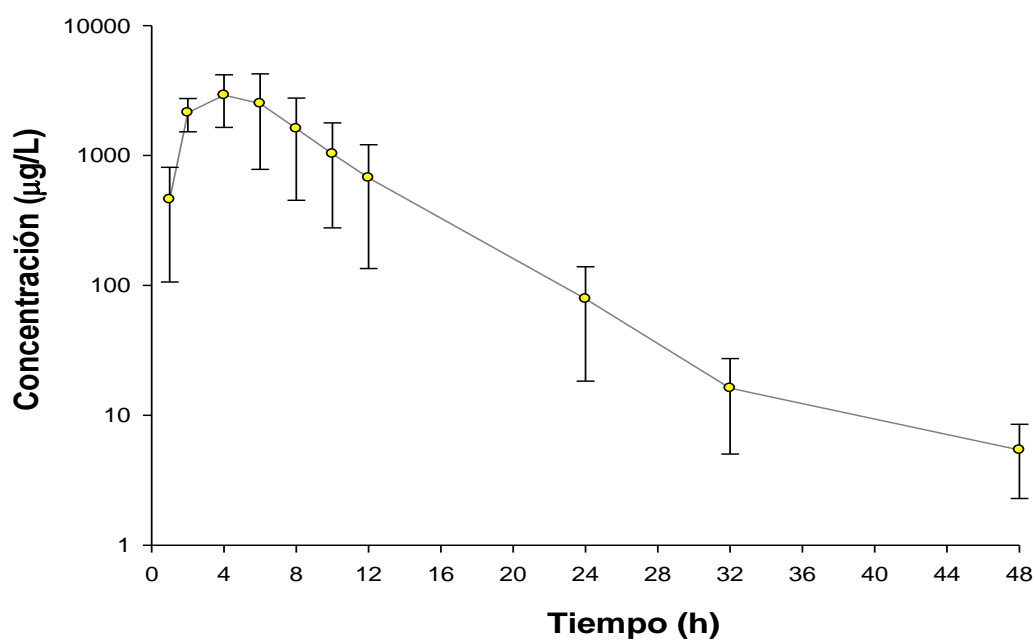


Gráfico 31.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de marbofloxacino excretadas en leche tras la administración de una dosis de 6 mg/kg vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) en cabras.

En la Tabla 31, se muestran las cantidades de marbofloxacino en microgramos, excretadas en leche para cada animal en los diferentes tiempos de ordeño, tras la administración subcutánea de 6 mg/kg de peso en solución del polímero P407 al 25% junto con sus valores promedio y sus estadísticos de dispersión.

En la tabla 32 se presentan los parámetros farmacocinéticos no compartimentales obtenidos en cada cabra, y sus promedios y estadísticos de desviación, junto con los ratios $AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{plasma}}$, $C_{\text{máx-leche}}/C_{\text{máx-plasma}}$ y el porcentaje de excreción.

Tiempo	Cantidad excretada en leche para los animales sometidos a estudio (cabras)								
	1	2	3	4	5	6	Media	S.D.	C.V.
1	95,56	74,04	70,90	89,52	372,77	116,18	136,50	116,90	85,64
2	464,67	184,91	168,08	297,67	137,63	324,80	262,96	123,70	47,04
4	689,76	805,05	588,81	643,47	277,93	464,03	578,17	185,19	32,03
6	561,19	510,48	546,40	607,33	230,60	472,69	488,12	134,16	27,49
8	361,42	170,63	329,45	282,84	259,31	154,23	259,65	83,43	32,13
10	215,53	124,04	218,72	157,94	221,63	50,78	164,77	68,44	41,54
12	234,36	50,87	117,44	110,69	139,99	35,84	114,86	71,10	61,90
24	165,77	50,08	76,61	87,17	89,10	35,68	84,07	45,30	53,89
32	39,47	11,41	10,70	17,87	13,06	12,32	17,47	11,07	63,35
48	10,85	4,68	1,49	5,61	5,94	6,93	5,92	3,05	51,60

Tabla 31.- Cantidad de marbofloxacino excretada en leche, en μg , tras la administración subcutánea de una dosis de 6mg/kg en solución del polímero P407 al 25% junto con sus valores promedio y sus estadísticos de desviación

Parámetros	Animales sometidos a estudio (cabras)								
	1	2	3	4	5	6	Media	S.D.	C.V.
$C_{\text{máx}}$	3630,30	3326,65	4630,54	3201,34	1462,80	2194,57	3074,37	1111,91	36,17
$T_{\text{máx}}$	4,00	4,00	6,00	4,00	4,00	2,00	4,00	1,26	31,62
AUC	30991,58	20877,62	36360,66	27365,20	15461,11	14482,71	24256,48	8784,52	36,22
MRT	8,53	6,48	8,00	7,50	8,13	6,61	7,54	0,84	11,13
$AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{plasma}}$	1,72	0,75	1,40	1,17	0,82	0,84	1,12	0,39	34,65
$C_{\text{máx-leche}}/C_{\text{máx-plasma}}$	1,89	0,97	1,14	1,50	0,47	1,26	1,21	0,48	39,98
% excreción	0,89	0,63	0,52	1,52	0,51	0,56	0,77	0,39	50,81

Tabla 32.- Parámetros farmacocinéticos no compartimentales, obtenidos para la leche, deducidos tras la administración subcutánea de marbofloxacino en solución del polímero P407 al 25%, a dosis de 6 mg/kg , a cada una de las cabras junto con sus estadísticos de desviación.

El Gráfico 32 presenta, en escala semilogarítmica, las concentraciones experimentales detectadas en plasma y en leche, para cada cabra, tras la administración subcutánea de marbofloxacino en solución del polímero P407 al 25%, a la dosis de 6 mg/kg .

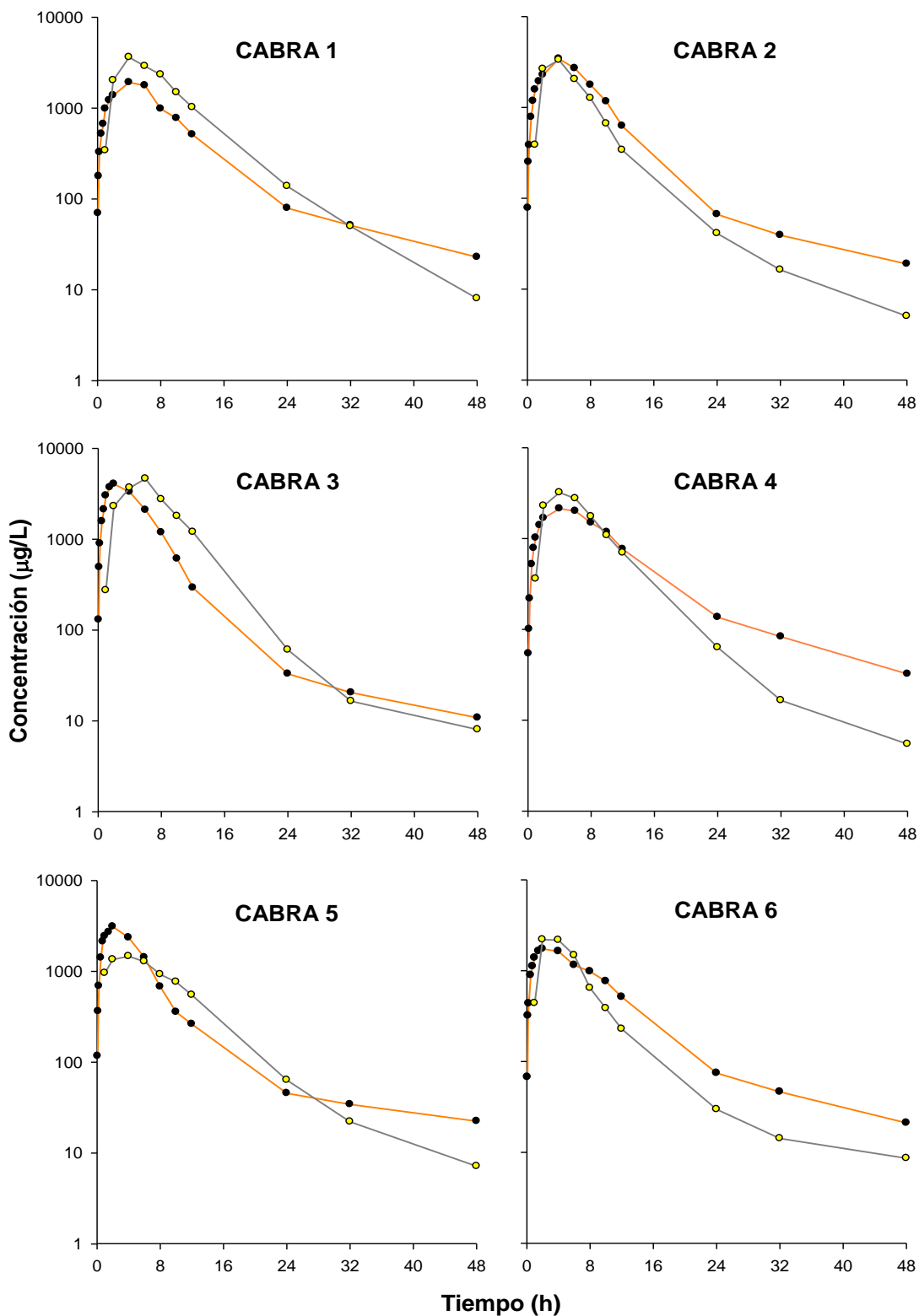


Gráfico 32.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de marbofloxacin obtenidas en plasma (*línea naranja*), y en leche (*línea gris*), tras la administración subcutánea de 6mg/kg de marbofloxacin en solución del polímero P407 al 25% a cabras.

El gráfico 33 presenta los valores medios (media \pm SD) de las concentraciones en plasma y en leche. Se observa que los niveles en leche son superiores a los plasmáticos desde las 2 horas hasta las 24 horas, siendo inferiores hasta las 48 horas.

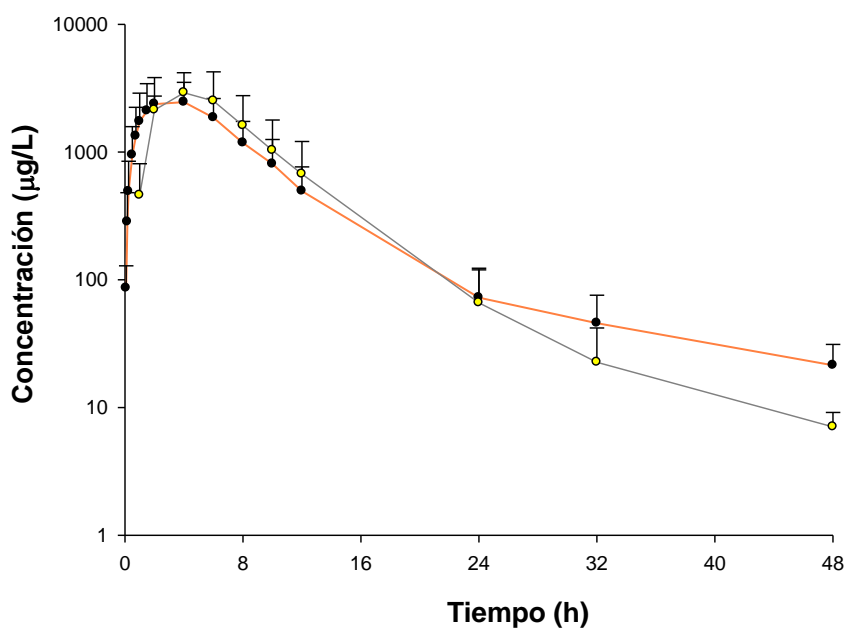


Gráfico 33.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de marbofloxacino obtenidas en plasma (*línea naranja*), y en leche (*línea gris*), tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% a cabras.

4.10.- EXCRECIÓN A TRAVÉS DE LA LECHE DE MARBOFLOXACINO: ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA EN SOLUCIÓN DEL POLÍMERO P407 AL 25% + CARBOXIMETILCELULOSA AL 2%.

En la Tabla 33, se muestran las concentraciones experimentales de marbofloxacino, obtenidas en la leche de los animales tratados con una dosis subcutánea de 6 mg/kg de peso en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% junto con sus estadísticos de desviación.

Tiempo	Concentración excretada en leche para los animales sometidos a estudio (cabras)								
	1	2	3	4	5	6	Media	S,D,	C,V,
1	688,22	414,78	489,38	272,43	1265,23	814,28	688,22	355,06	51,59
2	1442,84	1799,12	1194,60	1355,95	2589,40	1742,28	1442,84	498,32	34,54
4	1514,30	2660,55	2158,41	2406,78	2013,66	1895,45	1514,30	400,92	26,48
6	1778,16	2033,87	2360,00	2367,37	1475,26	1871,14	1778,16	347,77	19,56
8	1509,43	844,90	1984,76	1459,95	1403,24	1632,48	1509,43	371,00	24,58
10	817,72	438,73	1603,49	792,27	752,46	1057,89	817,72	392,96	48,06
12	556,24	172,08	1373,47	530,71	393,67	774,46	556,24	413,37	74,32
24	51,74	18,72	146,33	44,23	57,50	85,19	51,74	44,26	85,55
32	15,71	5,09	29,98	8,84	12,69	19,46	15,71	8,78	55,89
48	3,79	4,29	16,38	4,37	2,09	7,42	3,79	5,19	137,07

Tabla 33.- Concentraciones experimentales de marbofloxacino excretadas en leche, expresadas en µg/L, en cada cabra tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% junto con sus estadísticos de desviación.

La homogeneidad de los datos se analiza mediante el test de Kruskal-Wallis (tabla 34).

Pruebas de Bondad de Ajuste para la Concentración		
Prueba de Kruskal-Wallis para Concentración por Animales	Valor-P*	0,8577
Prueba de Kruskal-Wallis para Concentración por Tiempo	Valor-P*	5,2323 x 10 ⁻⁷

* Se compara con un valor de probabilidad de 0,05 para un 95% de nivel de confianza.

TABLA 34.- Test estadístico de Kruskal-Wallis para las concentraciones plasmáticas de marbofloxacino excretadas en leche, tras la administración de una dosis subcutánea de de 6 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% a cabras.

Los gráficos 34 y 35 representan, en escala semilogarítmica, las concentraciones determinadas en leche para cada cabra, y el valor promedio calculado (\pm S.D.) respectivamente.

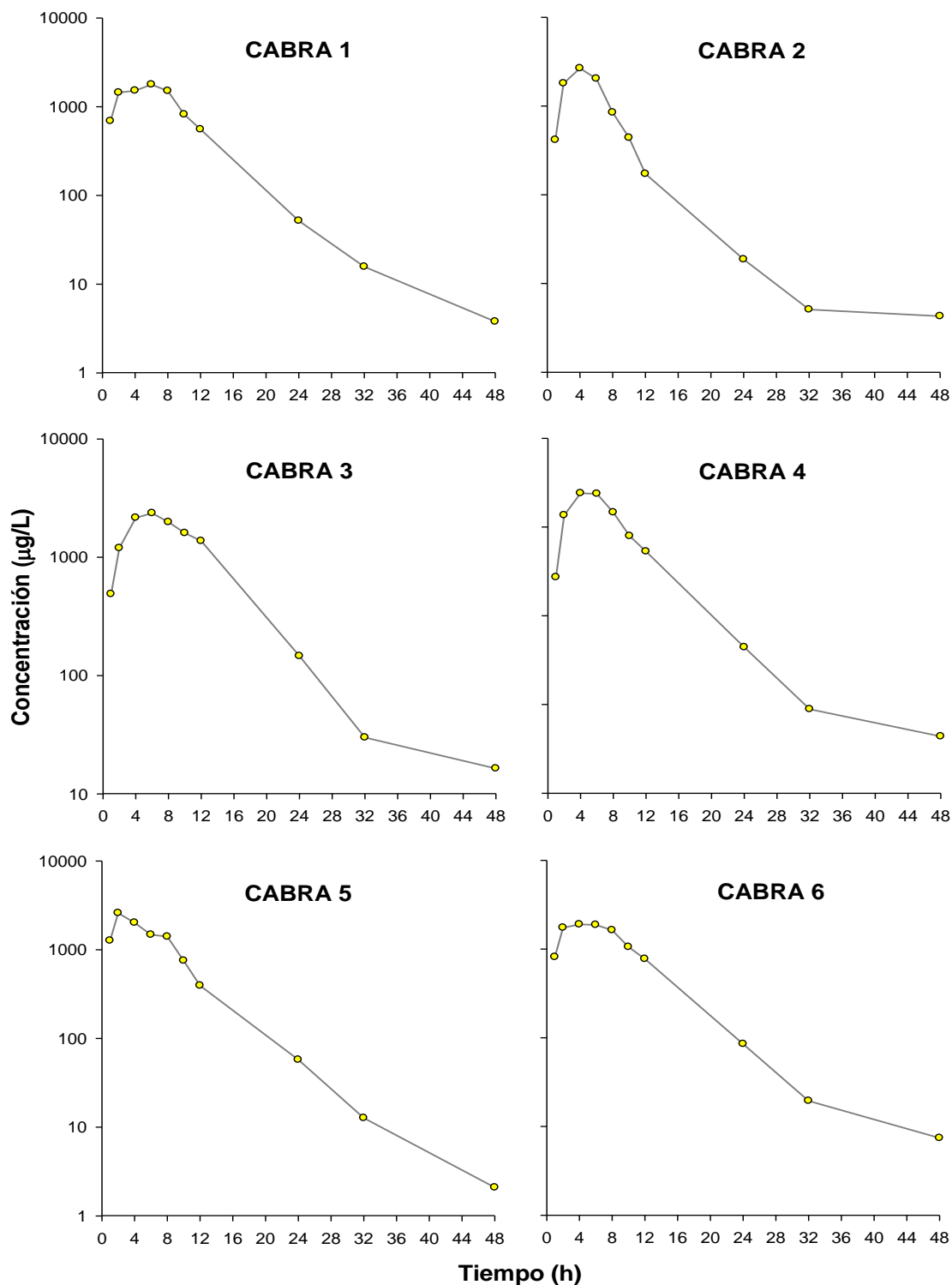


Gráfico 34.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones detectadas en leche, para cada cabra, tras la administración subcutánea de 6mg/kg de marbofloxacin en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2%.

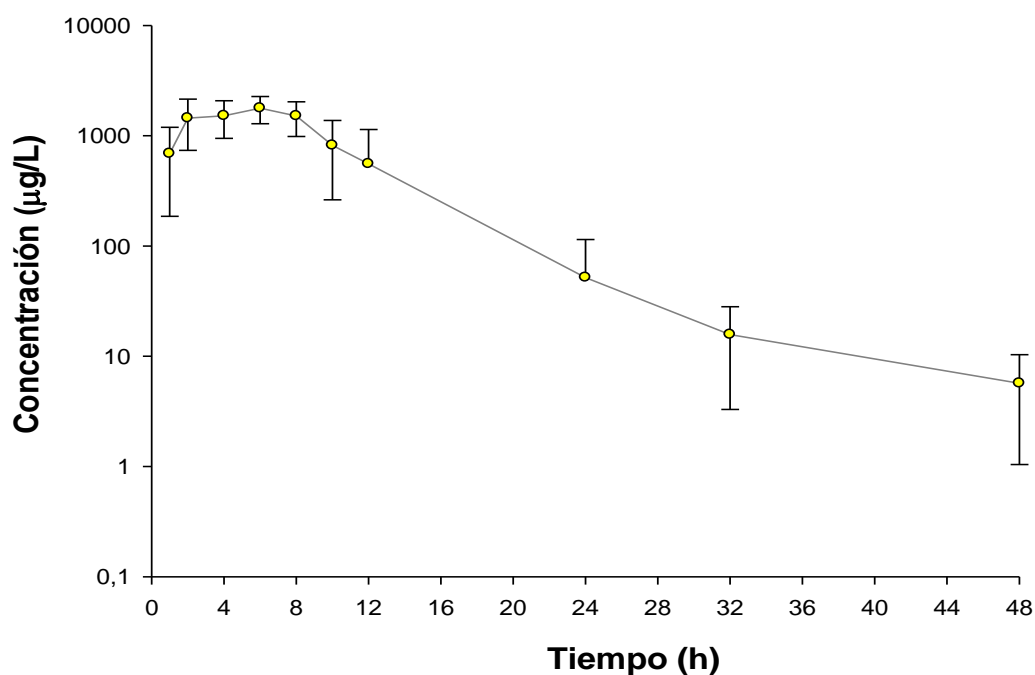


Gráfico 35.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de marbofloxacino excretadas en leche tras la administración de una dosis de 6 mg/kg vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) en cabras.

En la Tabla 35, se muestran las cantidades de marbofloxacino en microgramos, excretadas en leche para cada animal en los diferentes tiempos de ordeño, tras la administración subcutánea de 6 mg/kg de peso en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% junto con sus estadísticos de desviación. En la tabla 36 se presentan los parámetros farmacocinéticos no compartimentales obtenidos en cada cabra, y sus promedios y estadísticos de desviación, junto con los ratios $AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{plasma}}$, $C_{\text{máx-leche}}/C_{\text{máx-plasma}}$ y el porcentaje de excreción.

Tiempo	Cantidad excretada en leche para los animales sometidos a estudio (cabras)								
	1	2	3	4	5	6	Media	S.D.	C.V.
1	264,96	105,77	159,54	62,66	733,84	350,41	279,53	246,27	88,10
2	101,00	122,34	117,07	65,09	183,85	138,80	121,36	39,52	32,57
4	121,14	558,72	198,57	529,49	644,37	310,85	393,86	213,41	54,19
6	480,10	518,64	306,80	520,82	330,46	389,20	424,34	95,05	22,40
8	407,55	82,80	301,68	131,40	308,71	349,35	263,58	127,85	48,50
10	73,60	94,33	232,51	160,04	129,42	143,52	138,90	55,81	40,18
12	105,69	22,71	208,77	74,30	143,30	182,26	122,84	69,29	56,41
24	60,01	18,72	109,74	49,10	100,06	103,65	73,55	36,62	49,79
32	16,50	4,89	19,78	9,55	22,96	22,83	16,09	7,41	46,09
48	3,37	3,35	7,54	3,76	3,14	7,05	4,70	2,02	43,07

Tabla 35.- Cantidad de marbofloxacino excretada en leche, en μg , en cada cabra tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% junto con sus valores promedio y sus estadísticos de desviación.

Parámetros	Animales sometidos a estudio (cabras)								
	1	2	3	4	5	6	Media	S.D.	C.V.
$C_{\text{máx}}$	1778,16	2660,55	2360,00	2406,78	2589,40	1895,45	2281,72	364,07	15,96
$T_{\text{máx}}$	6,00	4,00	6,00	4,00	2,00	4,00	4,33	1,51	34,74
AUC	18757,28	16635,94	30258,84	20706,48	19953,87	22985,07	21549,58	4756,25	22,07
MRT	7,87	6,11	9,70	7,46	6,70	8,32	7,69	1,27	16,45
$AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{plasma}}$	1,07	0,81	1,46	1,18	1,33	1,64	1,25	0,30	23,72
$C_{\text{máx-leche}}/C_{\text{máx-plasma}}$	0,94	0,90	1,13	1,09	1,50	1,23	1,13	0,22	19,27
% excreción	0,51	0,48	0,40	0,52	0,76	0,67	0,56	0,13	23,55

Tabla 36.- Parámetros farmacocinéticos no compartimentales, obtenidos para la leche, deducidos tras la administración subcutánea de marbofloxacino en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2%, a dosis de 6 mg/kg, a cada una de las cabras junto con sus valores promedio y sus estadísticos de desviación.

En el Gráfico 36 se representa, en escala semilogarítmica, las concentraciones experimentales detectadas en plasma y en leche, para cada cabra, tras la administración subcutánea de marbofloxacino en solución del polímero P407 al 25%, a la dosis de 6 mg/kg. En el gráfico 27 se representan sus respectivos valores promediados (media \pm D).

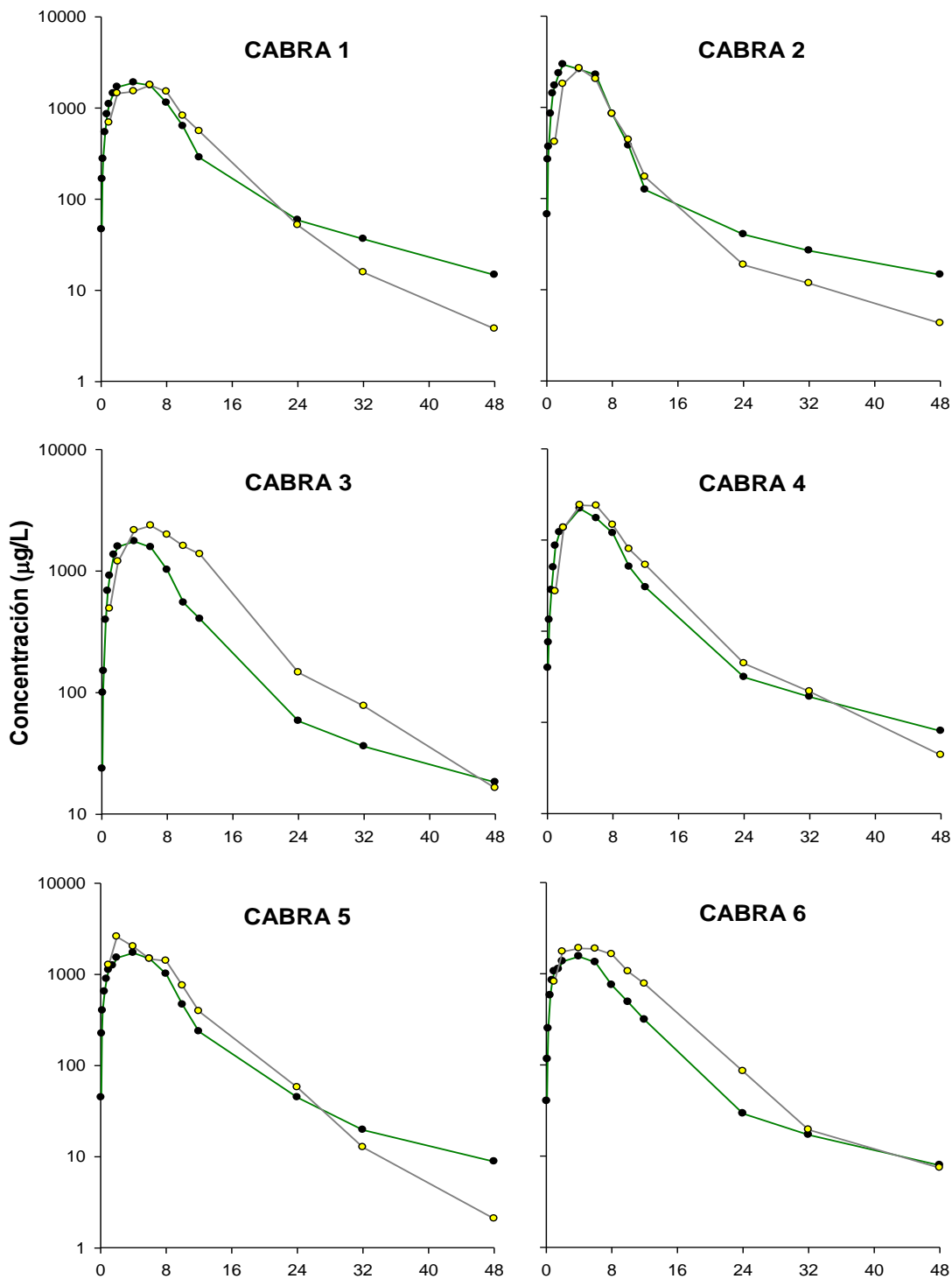


Gráfico 36.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de marbofloxacin obtenidas en plasma (*línea verde*), y en leche (*línea gris*), tras la administración subcutánea de 6mg/kg de marbofloxacin en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% a cabras.

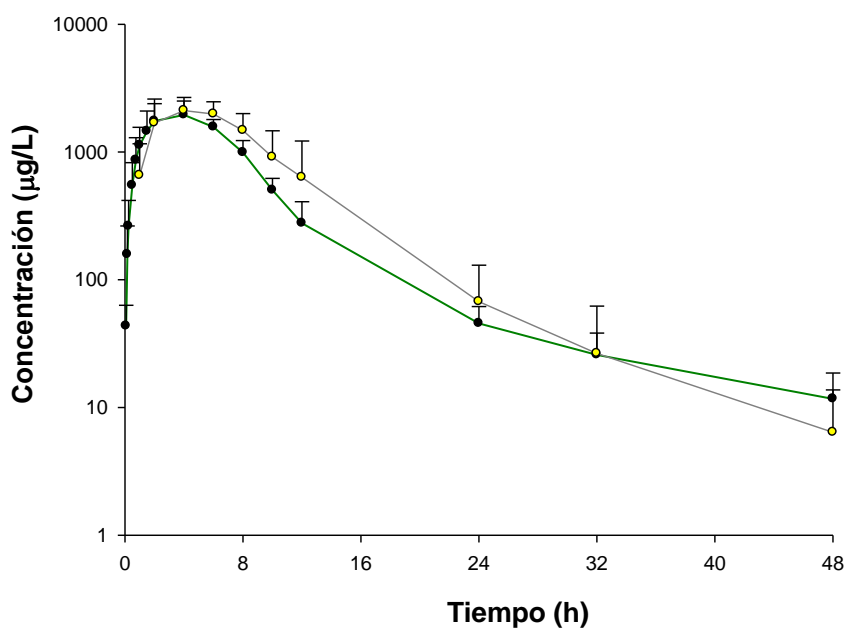


Gráfico 37.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de marbofloxacino obtenidas en plasma (*línea verde*), y en leche (*línea gris*), tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% a cabras.

Como podemos observar en el Gráfico 36, las concentraciones en leche de marbofloxacino son iguales o superiores a las plasmáticas desde las 2-4 horas y se mantienen así hasta las 24 horas en todas las cabras menos en la cabra 3. La tendencia general, observada en el gráfico 37 de los valores promediados, indica que los niveles en leche son superiores a los plasmáticos desde las 2 horas hasta las 32 horas. Desde las 32 – 48 h los niveles se mantienen equilibrados.

4.11.- COMPARACIÓN DE LOS PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DE MARBOFLOXACINO EN LECHE TRAS SU ADMINISTRACIÓN VÍA INTRAVENOSA, SUBCUTÁNEA, SUBCUTÁNEA EN SOLUCIÓN DEL POLÍMERO P407 AL 25% Y SUBCUTÁNEA EN SOLUCIÓN DEL POLÍMERO P407 AL 25% + CARBOXIMETILCELULOSA AL 2%.

En la Tabla 37, vienen reflejados los valores medios de los principales parámetros farmacocinéticos no compartimentales, de marbofloxacino obtenidos para la leche, tras la administración intravenosa de una dosis de 2 mg/kg de marbofloxacino vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC), y tras la administración de una dosis de 6 mg/kg vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2).

Parámetros	IV	SC	SC1	SC2
$C_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{g/L}$)	1253,41	1692,71	3074,37	2281,72
$T_{m\acute{a}x}$ (h)	2,17	2,33	4,00	4,33
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$)	6239,43	8308,65	24256,48	21549,58
MRT (h)	5,05	5,16	7,54	7,69
$AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{plasma}}$	0,86	0,97	1,12	1,25
$C_{m\acute{a}x\text{-leche}}/C_{m\acute{a}x\text{-plasma}}$	0,35	0,81	1,21	1,13
% excreción	1,03	0,64	0,77	0,56

Tabla 37.- Valor medio de los parámetros farmacocinéticos no compartimentales de marbofloxacino obtenidos en leche, tras la administración de una dosis de 2 mg/kg por vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC), y tras la administración de una dosis de 6 mg/kg por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a cabras.

La representación gráfica (en escala semilogarítmica) de los valores medios (\pm SD) experimentales de concentración en leche obtenidos tras la administración de marbofloxacino por las vías IV, SC, SC1 y SC2, aparecen en el Gráfico 38, y en el Gráfico 39 los valores medios (\pm SD) de las tres administraciones subcutáneas.

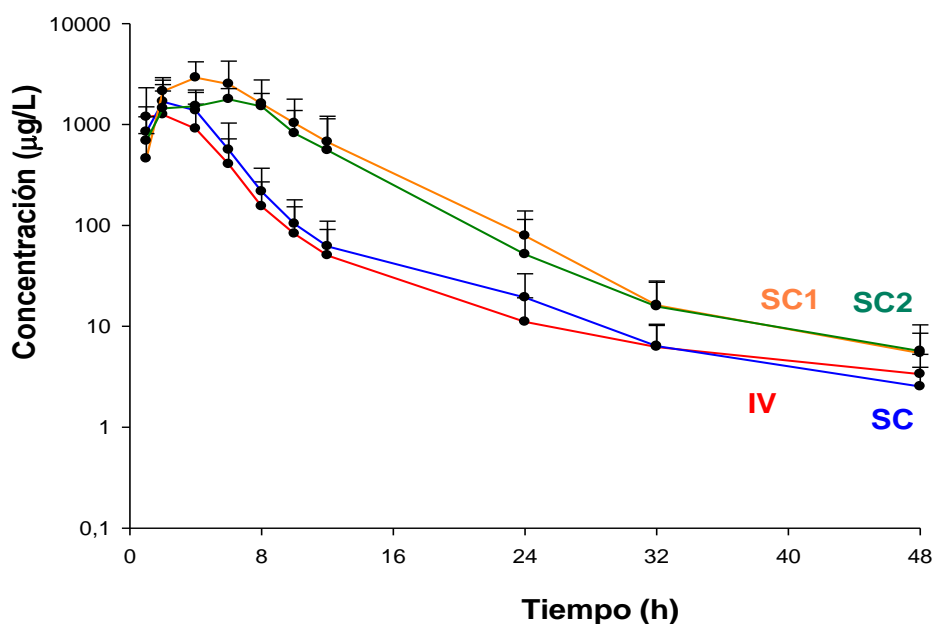


Gráfico 38.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de marbofloxacino obtenidas en leche tras la administración de una dosis de 2 mg/kg por vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC), y de una dosis de 6 mg/kg por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a cabras.

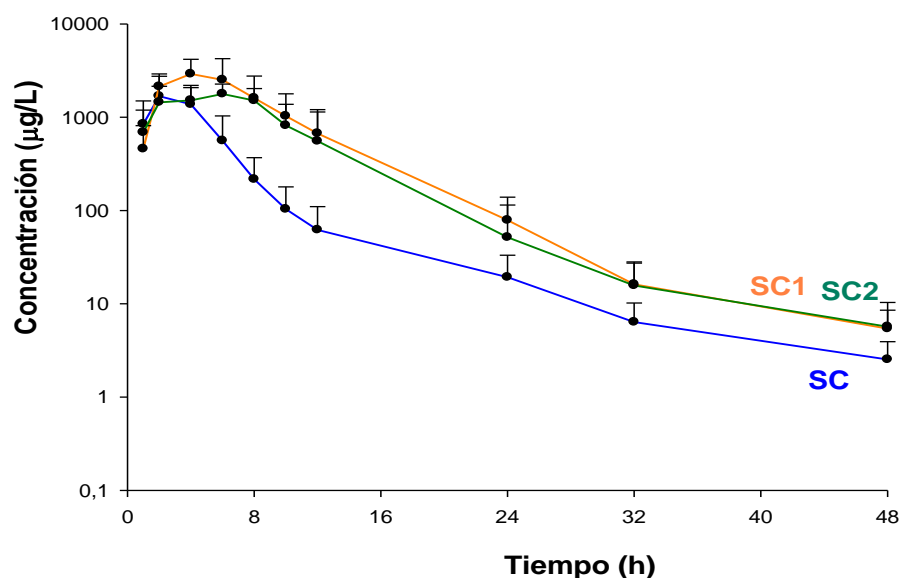


Gráfico 39.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de marbofloxacino obtenidas en leche tras la administración de una dosis de 2 mg/kg por vía subcutánea (SC), y de una dosis de 6 mg/kg por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a cabras.

Para verificar la existencia o no de diferencias significativas entre los parámetros farmacocinéticos no compartimentales en leche obtenidos tras las administraciones de marbofloxacino vía IV, SC, SC1 y SC2, así como las ratios leche/plasma de las áreas y las concentraciones máximas se ha realizado el test de Kruskal-Wallis. Los resultados del mismo se muestran en la Tabla 38 en lo que a los valores de P se refiere.

Parámetros	Probabilidad (significación)	Parámetros	Probabilidad (significación)
$C_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{g/L}$)	0,027	$AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{plasma}}$	0,30
$T_{m\acute{a}x}$ (h)	0,013	$C_{m\acute{a}x\text{-leche}}/C_{m\acute{a}x\text{-plasma}}$	$3,8 \cdot 10^{-03}$
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$)	$5,5 \cdot 10^{-04}$	% excreción	0,75
MRT (h)	$5,8 \cdot 10^{-04}$	-	-

P < 0,05: diferencias significativas; P > 0,05: diferencias no significativas.

Tabla 38.- Estudio comparativo no paramétrico (H Kruskal-Wallis) entre los principales parámetros farmacocinéticos no compartimentales de marbofloxacino en leche, obtenidos tras la administración de una dosis de 2 mg/kg por vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC), y tras la administración de una dosis de 6 mg/kg por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a cabras.

La comparación de los parámetros y ratios en leche, en todas las vías de administración IV y SC, SC1 y SC2, para todos los animales, muestra la existencia de diferencias significativas en los valores del área bajo la curva ($AUC_{0-\infty \text{ leche}}$), de la concentración máxima en leche ($C_{m\acute{a}x}$), del tiempo en que se alcanza dicha concentración ($T_{m\acute{a}x}$), del tiempo medio de residencia (MRT) y del ratio entre las concentraciones máximas en leche y plasma ($C_{m\acute{a}x\text{-leche}}/C_{m\acute{a}x\text{-plasma}}$).

En cuanto al porcentaje de fármaco excretado en leche y el ratio entre las áreas bajo la curva entre leche y plasma ($AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{plasma}}$), el test no paramétrico pone de manifiesto la no existencia de diferencias significativas entre las vías de administración IV y SC, SC1 y SC2.

Una vez realizada la prueba de Kruskal-Wallis, se realiza una segunda prueba no paramétrica en aquellos parámetros que muestran diferencias significativas, empleando la suma de rangos de Wilcoxon para muestras pareadas cuyos resultados se muestran en la tabla 39.

Parámetros	P _{SC/IV}	P _{SC1/IV}	P _{SC2/IV}	P _{SC1/SC}	P _{SC2/SC}	P _{SC1/SC2}
C _{máx} (μg/L)	1,000	0,036	0,093	0,140	0,142	0,208
T _{máx} (h)	1,000	0,054	0,089	0,119	0,095	0,773
AUC (μg*h/L)	0,530	0,036	0,036	0,036	0,036	0,530
MRT (h)	0,675	0,036	0,036	0,036	0,036	1,000
C _{máx-leche} /C _{máx-plasma}	0,036	0,036	0,036	0,293	0,059	0,401

P<0,05: diferencias significativas; P>0,05: diferencias no significativas.

Tabla 39.- Estudio comparativo no paramétrico (t de Wilcoxon) entre los principales parámetros farmacocinéticos no compartimentales y ratios leche plasma obtenidos tras la administración de una dosis de 2 mg/kg de marbofloxacino por vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC), y tras la administración de una dosis de 6 mg/kg de marbofloxacino por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a cabras.

Podemos observar en dicha tabla que:

a) Comparación entre la concentración máxima en leche (C_{máx}) y el tiempo en que se alcanza dicha concentración (T_{máx}) entre vías: no se observan diferencias significativas en ninguna vía salvo en la relación entre la vía intravenosa y la SC1 del primer parámetro, y ninguna diferencia para el segundo.

b) Comparación de las áreas bajo la curva (AUC_{0-∞} leche) y el tiempo medio de residencia (MRT): sólo se observan diferencias significativas para ambos parámetros cuando se comparan formulaciones convencionales con poliméricas, y viceversa, pero no se observan cuando se comparan formulaciones convencionales entre sí, o poliméricas entre sí.

c) Comparación de los ratios entre las concentraciones máximas en leche y plasma (C_{máx-leche}/C_{máx-plasma}): sólo hay diferencia al comparar las vía extravasculares (utilizando formulaciones convencionales o poliméricas) con la intravenosa, pero no entre ellas.

4.12.- PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS-FARMACODINÁMICOS OBTENIDOS FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus*.

En la Tabla 40 se muestran las concentraciones mínimas inhibitorias y las concentraciones preventivas de mutantes ($\mu\text{g/mL}$) de marbofloxacino obtenidas frente a 12 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de la leche de cabras lactantes con infecciones intramamarias. También se incluyen 2 cepas control de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Los resultados obtenidos son $\text{MIC}_{50} = 0,12 \mu\text{g/mL}$, $\text{MIC}_{90} = 0,25 \mu\text{g/mL}$ y un rango de $0,12 - 1,00 \mu\text{g/mL}$, $\text{MPC}_{90} = 1,00 \mu\text{g/mL}$, rango de $0,25 - 1,00 \mu\text{g/mL}$ e índice MPI ($\text{MPC}_{90}/\text{MIC}_{90}$) = 4,00.

Niveles de concentración ($\mu\text{g/mL}$ de marbofloxacino),											
Especies/ Origen	n	$\leq 0,03$	0,06	0,12	0,25	0,50	1,00	$\geq 2,00$	MIC_{50}	MIC_{90}	Rango
<i>S.aureus</i> Leche de Cabra	12			9	2	1			0,12	0,50	0,12 – 1,0
<i>S.aureus</i> ATCC 29213	1				1						
<i>E.coli</i> ATCC 25922	1	1									
Niveles de concentración ($\mu\text{g/mL}$ de marbofloxacino),											
Especies/ Origen	n	$\leq 0,03$	0,06	0,12	0,25	0,50	1,00	$\geq 2,00$	MPC_{90}	MPI	Rango
<i>S.aureus</i> Leche de Cabra	12			2	4	2	4		1,00	2,00	0,25 – 1,0
<i>S.aureus</i> ATCC 29213	1					1			MPI	2,00	
<i>E.coli</i> ATCC 25922	1					1				15,62	

Tabla 40.- Concentraciones mínimas inhibitorias y preventivas de mutantes ($\mu\text{g/mL}$) de marbofloxacino frente a 12 cepas aisladas de *S.aureus* y 2 cepas patrón de *S.aureus* y *E.coli*, de cabras lactantes con infecciones intramamarias.

Como se ha mencionado anteriormente, entre los ratios farmacocinético–farmacodinámicos (PK-PD) que predicen una mejor eficacia se encuentran el $\text{AUC}_{0-24}/\text{MIC}_{50}$ y $\text{AUC}_{0-24}/\text{MIC}_{90}$ así como $\text{C}_{\text{máx}}/\text{MIC}_{50}$ y $\text{C}_{\text{máx}}/\text{MIC}_{90}$. Estos ratios calculados para cada animal en función de sus parámetros farmacocinéticos en plasma, junto con sus estadísticos asociados, se muestran en la Tabla 41.

		Animales sometidos a estudio (Cabras)								
Vía	Ratio PK-PD	1	2	3	4	5	6	Promedio	S.D.	C.V.
IV	AUC ₀₋₂₄ /MIC ₅₀ (h)	68,66	61,30	46,84	42,56	46,88	58,00	54,04	9,28	17,18
SC	AUC ₀₋₂₄ /MIC ₅₀ (h)	90,04	67,89	67,88	30,17	66,76	49,18	61,99	18,51	90,04
SC1	AUC ₀₋₂₄ /MIC ₅₀ (h)	131,91	204,08	192,29	170,85	140,76	125,63	160,92	30,11	18,71
SC2	AUC ₀₋₂₄ /MIC ₅₀ (h)	126,09	67,89	192,29	170,85	66,76	49,18	163,08	33,78	20,71
IV	C ₀ /MIC ₅₀	40,36	52,84	36,85	43,09	33,12	34,71	40,16	7,21	17,94
SC	C _{max} /MIC ₅₀	21,12	20,35	20,62	7,97	16,05	13,45	16,59	4,75	21,12
SC1	C _{max} /MIC ₅₀	14,74	26,40	31,23	16,40	23,87	13,36	21,00	6,59	14,74
SC2	C _{max} /MIC ₅₀	14,56	22,67	13,48	16,91	13,25	11,88	15,46	3,57	14,56
IV	AUC ₀₋₂₄ /MIC ₉₀ (h)	17,85	15,94	12,18	11,07	12,19	15,08	14,05	2,64	18,82
SC	AUC ₀₋₂₄ /MIC ₉₀ (h)	23,41	17,65	17,65	7,84	17,36	12,79	16,12	5,27	32,71
SC1	AUC ₀₋₂₄ /MIC ₉₀ (h)	34,30	53,06	50,00	44,42	36,60	32,66	41,84	8,58	20,50
SC2	AUC ₀₋₂₄ /MIC ₉₀ (h)	32,78	17,65	50,00	44,42	17,36	12,79	29,17	15,62	53,56
IV	C ₀ /MIC ₉₀	10,49	13,74	9,58	11,20	8,61	9,03	10,44	1,87	17,94
SC	C _{max} /MIC ₉₀	3,79	5,89	3,51	4,40	3,44	3,09	4,02	1,02	25,30
SC1	C _{max} /MIC ₉₀	3,83	6,86	8,12	4,26	6,21	3,47	5,46	1,88	34,39
SC2	C _{max} /MIC ₉₀	3,79	5,89	3,51	4,40	3,44	3,09	4,02	1,02	25,30

Tabla 41.- Parámetros farmacocinéticos-farmacodinámicos de eficacia correspondientes a marbofloxacinó frente a aislados de *Staphylococcus aureus* en cabras calculados tras la administración de una dosis de 2 mg/kg por vía subcutánea (SC) y tras la administración por vía subcutánea de una dosis de 6 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y en solución de polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2).

De igual forma, en lo que se refiere a los ratios farmacocinético–farmacodinámicos (PK-PD) que previenen o reducen la aparición de resistencias para antibacterianos concentración dependientes se encuentran el AUC₀₋₂₄/MPC₅₀ y AUC₀₋₂₄/MPC₉₀ y también C_{max}/MPC₅₀ y C_{max}/MPC₉₀. Estos ratios calculados para cada animal en función de sus parámetros farmacocinéticos en plasma, junto con sus estadísticos asociados, se muestran en la Tabla 42.

		Animales sometidos a estudio (Cabras)								
Vía	Ratio PK-PD	1	2	3	4	5	6	Promedio	S.D.	C.V.
IV	AUC ₀₋₂₄ /MPC ₅₀ (h)	35,70	31,87	24,36	22,13	24,38	30,16	28,10	5,29	18,82
SC	AUC ₀₋₂₄ /MPC ₅₀ (h)	46,82	35,30	35,30	15,69	34,71	25,57	32,23	10,54	32,71
SC1	AUC ₀₋₂₄ /MPC ₅₀ (h)	68,59	106,12	99,99	88,84	73,20	65,33	83,68	17,15	20,50
SC2	AUC ₀₋₂₄ /MPC ₅₀ (h)	65,56	35,30	99,99	88,84	34,71	25,57	58,33	31,24	53,56
IV	C ₀ /MPC ₅₀	20,99	27,48	19,16	22,41	17,22	18,05	20,88	3,75	17,94
SC	C _{max} /MPC ₅₀	10,98	10,58	10,72	4,15	8,35	6,99	8,63	2,71	31,36
SC1	C _{max} /MPC ₅₀	7,67	13,73	16,24	8,53	12,41	6,95	10,92	3,75	34,39
SC2	C _{max} /MPC ₅₀	7,57	11,79	7,01	8,79	6,89	6,18	8,04	2,03	25,30
IV	AUC ₀₋₂₄ /MPC ₉₀ (h)	8,93	7,97	6,09	5,53	6,09	7,54	7,03	1,32	18,82
SC	AUC ₀₋₂₄ /MPC ₉₀ (h)	11,71	8,83	8,82	3,92	8,68	6,39	8,06	2,64	32,71
SC1	AUC ₀₋₂₄ /MPC ₉₀ (h)	17,15	26,53	25,00	22,21	18,30	16,33	20,92	4,29	20,50
SC2	AUC ₀₋₂₄ /MPC ₉₀ (h)	16,39	8,83	25,00	22,21	8,68	6,39	14,58	7,81	53,56
IV	C ₀ /MPC ₉₀	5,25	6,87	4,79	5,60	4,31	4,51	5,22	0,94	17,94
SC	C _{max} /MPC ₉₀	2,75	2,65	2,68	1,04	2,09	1,75	2,16	0,68	31,36
SC1	C _{max} /MPC ₉₀	1,92	3,43	4,06	2,13	3,10	1,74	2,73	0,94	34,39
SC2	C _{max} /MPC ₉₀	1,89	2,95	1,75	2,20	1,72	1,54	2,01	0,51	25,30

Tabla 42.- Parámetros farmacocinéticos-farmacodinámicos que previenen la aparición de mutantes correspondientes a marbofloxacino frente a aislados de *Staphylococcus aureus* en cabras calculados tras la administración de una dosis de 2 mg/kg por vía subcutánea (SC) y tras la administración por vía subcutánea de una dosis de 6 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y en solución de polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2).

5.-DISCUSIÓN

5.1.- INTRODUCCIÓN.

Desde el punto de vista del análisis compartimental, los valores de concentración plasmática de marbofloxacino en cabras obtenidos tras la administración de la formulación convencional por las vías intravenosa (IV) y subcutánea (SC) así como tras la administración de las dos formulaciones de liberación controlada en polaxamer 407 al 25 % por vía subcutánea (SC1) y en polaxamer al 25 con carboximetilcelulosa al 2% también por vía subcutánea (SC2), se han ajustado a modelos mono, bi y triexponenciales utilizando una ponderación con respecto a los inversos del cuadrado de la concentración. Hemos escogido esta ponderación porque es la que mejor ajusta los valores finales de concentración, que son de los más bajos, con sus respectivos tiempos y a permite obtener valores de semivida más aceptables (Toutain y Bousquet-Mélou, 2004).

El modelo compartimental se ha seleccionado siguiendo el Criterio de Información de Akaike (AIC) que establece una forma de escoger una función que sea lo más sencilla posible pero manteniendo un ajuste adecuado. Para ello, se establece que el mejor modelo sería aquel que presente un valor de AIC más bajo teniendo en cuenta que este valor es directamente proporcional al número de parejas de datos, a la suma de cuadrados ponderados y al número de parámetros de ajuste. Asumiendo pues que el número de parejas de datos no varía, pero que sí lo hacen la suma de cuadrados ponderados y el número de parámetros de ajuste, es de ellos de quien depende el valor del AIC. Así estos dos factores tienen una relación inversa entre sí, ya que teóricamente la suma de cuadrados ponderados disminuye conforme aumentamos el número de parámetros de ajuste. Se llega pues a una situación de compromiso (ver fórmula en página 87) en la que el AIC baja si desciende la suma de cuadrados a escala logarítmica y aumenta conforme se incrementa el número de parámetros de ajuste a escala natural (Yamaoka y cols., 1978a).

El modelo exponencial al que mejor se ajustan los datos de concentración plasmática es el modelo bicompartimental abierto sin absorción (dos exponenciales positivas tras la administración intravenosa) o con absorción de primer orden (tres exponenciales, dos de ellas positivas y una negativa tras la administración subcutánea de las tres formulaciones).

Para los modelos no compartimentales se ha seguido la regla lineal-trapezoidal en la fase ascendente y logarítmico-trapezoidal en la descendente sin ponderación.

5.2.- ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA DE MARBOFLOXACINO EN CABRAS.

5.2.1.- MODELO FARMACOCINÉTICO.

Las concentraciones plasmáticas de marbofloxacino a la dosis de 2 mg/kg por vía intravenosa en cabras (tabla 1), se han ajustado a un modelo bicompartimental abierto con ponderación inversa del cuadrado de las concentraciones, modelo con el que hemos obtenido en todos los casos un valor menor del AIC. Previo a este análisis se ha realizado un estudio de nuestros datos mediante un análisis de varianza no paramétrico (H de Kruskal-Wallis) que nos confirmase la no existencia de diferencias entre las concentraciones plasmáticas cuando se comparan las procedentes de los animales como fuente de variación, mientras que por otro lado, sí se encontrasen diferencias significativas entre las concentraciones cuando la fuente de variación fuesen los tiempos de extracción (tabla 2)

El modelo bicompartimental está de acuerdo con las características farmacocinéticas de las fluoroquinolonas, que presentan una buena distribución orgánica con una importante penetración a nivel intracelular (Brown, 1996). Varios estudios de administración intravenosa de marbofloxacino en cabras también obtienen un mejor ajuste del fármaco al modelo bicompartimental (Waxman y cols., 2001, Waxman y cols., 2003, Waxman y cols., 2004). Otros estudios realizados tras la administración intravenosa de marbofloxacino en distintas especies animales, también ajustan a un modelo bicompartimental: ovejas (Shem-Tov y cols., 1997), vacas (Shem-Tov y cols., 1997, Ismail y cols., 2007), équidos (Carretero y cols., 2002, González y cols., 2007), conejos (Abo El-Sooud, K.A y cols., 2009), gatos (Albarells y cols., 2005), perros (Lefebvre y cols 1998) y cerdos (Ding y cols., 2010).

El ajuste al modelo bicompartimental abierto tras la administración intravenosa de otras fluoroquinolonas en cabras también se ha encontrado para moxifloxacino (Fernández-Varón y cols., 2006a), danofloxacino (AliAbadi y Lees, 2001), enrofloxacino (Rao y cols., 2002a), pefloxacino (Abd El-Aty y Goudah, 2002), orbifloxacino (Marín y cols., 2007a), difloxacino (Marín y cols., 2007c) e ibafloxacino (Marín y cols., 2007b)

El modelo bicompartimental abierto fue introducido por T. Teorell en 1937 y posteriormente divulgado por J. Loo y S.Riegelman (1968). Este modelo intenta reflejar el hecho de que la distribución del fármaco en el organismo no es un proceso instantáneo. Se caracteriza por considerar al organismo compuesto por dos compartimentos, uno central correspondiente a los tejidos en los que se alcanza un rápido equilibrio en la distribución del fármaco (puede

considerarse instantánea) y uno periférico que corresponde a los tejidos en los que el equilibrio en la distribución precisa un tiempo más o menos dilatado para alcanzarse (Doménech y cols., 1997). Dependiendo de que el proceso de eliminación se produzca desde el compartimento central, o desde el compartimento periférico, se obtendrán distintos modelos posibles. En nuestro caso hemos considerado que la eliminación se produce desde el compartimento central.

El modelo bicompartimental abierto tras una dosis intravenosa, viene definido por la siguiente ecuación:

$$C = C_1 \cdot e^{-\lambda_1 t} + C_z \cdot e^{-\lambda_z t} \quad (1)$$

Esta ecuación adquiere diferentes valores para cada animal (Tabla 3), es por ello que para hallar la ecuación que mejor define la evolución de las concentraciones plasmáticas de marbofloxacino en la cabra, se deben llevar a cabo estudios estadísticos que permitan calcular los valores medios para cada uno de los parámetros que intervienen en la misma. Dichos valores promedio se muestran en la Tabla 3.

Por consiguiente, la ecuación media que define la evolución de las concentraciones plasmáticas experimentales, en la cabra tras la administración intravenosa, de una dosis única de 2 mg/kg de marbofloxacino, adquiere el siguiente valor:

$$C = 3593,22 \cdot e^{-0,65t} + 178,85 \cdot e^{-0,14t} \quad \mu\text{g} / \text{L} \quad (2)$$

La representación semilogarítmica de las concentraciones individuales experimentales (Gráfico 1), pone de manifiesto que los niveles de marbofloxacino descienden rápidamente en una fase inicial para después hacerlo de forma más paulatina, dando lugar a una segunda fase, que podría considerarse monoexponencial y que se mantiene hasta el final del proceso (hasta las 32 horas tras la administración).

Este hecho se aprecia más claramente al observar la representación semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (Gráfico 2), en las que se diferencia una fase lineal correspondiente a la parte media y final de la curva, y una fase inicial que es susceptible de descomponerse en otra recta de pendiente más pronunciada que la anterior.

La transformación de esta recta semilogarítmica, en su ecuación exponencial correspondiente, desarrolla la expresión biexponencial ya indicada en la ecuación 2. Por tanto, la

desaparición de marbofloxacino del plasma de cabra, está regida por dos constantes híbridas de disposición. La primera de ellas, o constante de disposición rápida (k_{12} o k_{11}), rige fundamentalmente los procesos de distribución y la segunda o constante de disposición lenta (k_{21} o k_{10}), los procesos de eliminación. Una vez alcanzado el equilibrio en la distribución, la constante de disposición rápida (k_{12}), deja de tener influencia práctica, por lo que se puede asumir que la desaparición de marbofloxacino del plasma en cabras, queda determinada por la constante de la última fase o constante de disposición lenta (k_{21}). Por definición, el valor de k_{12} es siempre superior al de k_{21} (Doménech y cols., 1997).

El descenso rápido inicial de las concentraciones plasmáticas, implica una rápida distribución a los tejidos, durante la primera fase, seguida de una distribución más lenta en la siguiente, detectándose concentraciones de marbofloxacino en plasma hasta las 32 horas.

5.2.2.- PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS.

A continuación se van a comentar los parámetros farmacocinéticos más representativos de marbofloxacino tras su administración intravenosa a cabras (tablas 3 y 4).

5.2.2.1.- CONSTANTES HÍBRIDAS DE DISPOSICIÓN RÁPIDA Y LENTA.

Las constantes k_{12} y k_{21} se denominan constantes híbridas de disposición rápida y lenta por englobar los procesos de distribución y eliminación del fármaco (Doménech y cols., 1997), si bien la primera participa preferentemente en la distribución mientras que la segunda lo hace en la eliminación. Ambas son de primer orden (Pla y del Pozo, 1974).

En el presente estudio, los valores medios de estas constantes para el marbofloxacino han sido de $0,65 \text{ h}^{-1}$ y $0,14 \text{ h}^{-1}$ para k_{12} y k_{21} , respectivamente. Valores similares fueron obtenidos en un estudio realizado con el mismo fármaco en cabras, concretamente $0,49 \text{ h}^{-1}$ y $0,10 \text{ h}^{-1}$ respectivamente (Waxman y cols 2001).

Las constantes híbridas de disposición pueden relacionarse mediante la razón k_{12}/k_{21} , que informa cuál de ellas controla principalmente los procesos de distribución y eliminación (Pla y Obach, 1982). Así, cuanto más elevado sea dicho cociente, tanto más bicompartimental puede considerarse la distribución del fármaco. En nuestro estudio, una relación k_{12}/k_{21} con un valor de $4,65 (\pm 1,56)$, es indicativo de la diferencia existente entre ambas fases y nos indica que la

distribución de marbofloxacino es, preferentemente, bicompartimental y que la constante λ_z es la que controla principalmente los procesos anteriormente citados, ya que los regula durante más tiempo.

Los estudios realizados con marbofloxacino administrado intravenosamente en cabras, describen valores de estas constantes con el mismo orden de magnitud. En uno de ellos obtienen un valor de $0,49 \text{ h}^{-1}$ para λ_1 y $0,097 \text{ h}^{-1}$ para λ_z (Waxman y cols., 2001), mientras que en el segundo presentan un valor de $0,43 \text{ h}^{-1}$ para λ_1 y $0,095 \text{ h}^{-1}$ para λ_z (Waxman y cols., 2003). Un tercer estudio realizado en cabras de 1, 3 y 6 semanas y adultas aporta valores de $0,34 \text{ h}^{-1}$, $0,22 \text{ h}^{-1}$, $0,37 \text{ h}^{-1}$ y $0,49 \text{ h}^{-1}$ para λ_1 , y $0,072 \text{ h}^{-1}$, $0,084 \text{ h}^{-1}$, $0,107 \text{ h}^{-1}$ y $0,096 \text{ h}^{-1}$ para λ_z , respectivamente (Waxman y cols., 2004).

En la cabra, para otras fluoroquinolonas también se han obtenido valores de estas constantes. En el caso de danofloxacino, son de $1,46 \text{ h}^{-1}$ para λ_1 y $0,16 \text{ h}^{-1}$ para λ_z (Aliabadi y Lees, 2001). Con moxifloxacino Fernández-Varón y cols. (2006a) señalan valores de λ_1 y λ_z de $7,18 \text{ h}^{-1}$ y $0,41 \text{ h}^{-1}$. Con pefloxacino (Abd El-Aty y Goudah., 2002) se obtienen valores similares a los de Fernández-Varón y cols. (2006a), concretamente de $6,93 \text{ h}^{-1}$ y $0,43 \text{ h}^{-1}$ para λ_1 y λ_z . Para otras quinolonas se han obtenidos los siguientes valores de λ_1 y λ_z : para ibafloxacino 2 h^{-1} y $0,19 \text{ h}^{-1}$ (Marín y cols., 2007b) y para difloxacino, $0,92 \text{ h}^{-1}$ y $0,14 \text{ h}^{-1}$, respectivamente (Marín y cols., 2007c).

En ovejas, marbofloxacino presenta valores para λ_1 de $3,49 \text{ h}^{-1}$ y para λ_z de $0,335 \text{ h}^{-1}$ (Shem-Tov y cols., 1997), y de $1,54 \text{ h}^{-1}$ y $0,175 \text{ h}^{-1}$ para λ_1 y λ_z Sidhu y cols. (2010), inferiores y superiores, respectivamente, a los obtenidos en nuestro estudio.

5.2.2.2.- MICROCONSTANTES.

Las constantes λ_1 y λ_z , no son las verdaderas constantes de distribución y eliminación, ya que ambas participan en los dos procesos, las denominadas microconstantes son las que realmente los regulan.

En el modelo bicompartimental, considerando que la eliminación del fármaco se produce desde el compartimento central, existen tres microconstantes: la constante de transferencia del compartimento central al compartimento periférico (k_{12}), la constante de retorno del compartimento periférico al central (k_{21}) y la constante de eliminación desde el compartimento

central (k_{10}). Podemos observar esquemáticamente en la figura 1, los procesos de transferencia del fármaco entre los dos compartimentos, central y periférico, y el de eliminación desde el central.

En este modelo, el fármaco se distribuye instantáneamente en el compartimento central, desde el cual pasa al compartimento periférico de acuerdo con un proceso cinético de primer orden, regido por la constante de velocidad k_{12} y retorna hacia el compartimento central regido por la constante k_{21} . Desde el compartimento central se produce la eliminación, también regida por una constante de primer orden la constante k_{10} (Doménech y cols., 1997).

Los valores medios obtenidos para dichas constantes, en el caso de marbofloxacino en la cabra, son $k_{12} = 0,07 \text{ h}^{-1}$, $k_{21} = 0,16 \text{ h}^{-1}$ y $k_{10} = 0,55 \text{ h}^{-1}$ (Tabla 3). Esto pone de manifiesto que para cada animal la constante de eliminación desde el compartimento central (k_{10}) es la que adquiere un mayor valor, indicando una rápida eliminación del fármaco desde este compartimento. Este hecho parece indicar que el fármaco, si bien accede al compartimento periférico, tiene poca capacidad para acumularse o retenerse en el mismo.

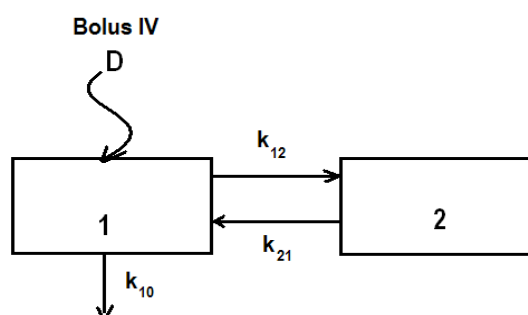


Figura 1.- Representación esquemática del modelo bicompartmental abierto tras la administración intravenosa de un fármaco.

Si observamos estas constantes podemos establecer relaciones de interés, como la relación λ_z/k_{10} , que alcanza un valor de 0,25 ($\pm 0,04$), y señala una eliminación global del antibacteriano desde todo el organismo, regida por una constante λ_z que siempre es inferior a la verdadera constante de eliminación (k_{10}), lo que confirma de nuevo la adecuación de la disposición de marbofloxacino a un modelo bicompartmental dado que, como después veremos, el volumen de distribución aparente del compartimento central (V_c) es muy pequeño en relación

al volumen de distribución aparente total en función del área (V_z) o algo menor respecto a al obtenido en estado estacionario (V_{ss}).

Del estudio de la relación k_{12}/k_{10} , se obtiene un valor de 0,13 ($\pm 0,03$). Como se puede observar, este valor es pequeño y nos indica que existe una velocidad de eliminación del fármaco del plasma, por metabolismo y excreción, muy superior a la de distribución del mismo. Que la velocidad de eliminación del fármaco sea muy superior a la de distribución, no quiere decir que el fármaco no se comporte como bicompartimental, sino que la velocidad de salida hacia el compartimento periférico es muy inferior que la velocidad de eliminación.

Si estudiamos la relación entre la constante de transferencia y retorno, desde el compartimento periférico k_{12}/k_{21} , esta adquiere el valor de 0,43 ($\pm 0,26$). Este resultado indica que el fármaco accede al compartimento periférico pero retorna más fácilmente del mismo al compartimento central, sin producirse retención del fármaco en dicho compartimento periférico.

Del análisis de la relación k_{21}/k_{10} , se obtiene un valor de 0,29 ($\pm 0,04$), por lo que el retorno del fármaco, del compartimento periférico al compartimento central, no condiciona su eliminación. Esto concuerda con que no existe retención del fármaco en el compartimento periférico.

5.2.2.3.- TIEMPO DE SEMIVIDA

La semivida de la fase de disposición rápida ($t_{1/2\lambda,1}$) para marbofloxacino, ha sido de 1,07 horas, y la de la fase de disposición lenta ($t_{1/2\lambda,z}$) de 5,61 horas (Tabla 3). Esta última se considera como tiempo de vida media o semivida del fármaco (Atkinson y Kushner, 1979; Gibaldi y Perrier, 1982, Rowland y Tozer, 2010).

El valor de la semivida de la fase de disposición rápida de nuestro estudio es prácticamente igual al obtenido para orbifloxacino en cabras (1,12 h; Marín y cols., 2007a), pero superior al obtenido en otras fluoroquinolanas como moxifloxacino (0,36 h; Fernández-Varón y cols., 2006a), levofloxacino (0,31 h; Goudah y cols., 2008), ibafloxacino (0,35 h; Marín y cols., 2007b), enrofloxacino (0,112 y 0,293 h; Rao y cols., 2002a, 2002b), ciprofloxacino (0,293 h: García Ovando, 2000).

El valor de la semivida ($t_{1/2\lambda,z}$) obtenido en nuestro estudio (5,61 h) es inferior al obtenido por Waxman y cols, 2001, para marblofloxacino en cabras (7,18 h), e inferior al obtenido con

enrofloxacino (10,44 h Titos, 2010), pero es superior al obtenido en estudios similares encontrados en cabras para otras fluoroquinolonas; moxifloxacino (1,94 h; Fernández-Varón y cols., 2006a), levofloxacino (2,95 h; Goudah y cols., 2008), danofloxacino (4,67 h; Aliabadi y cols., 2001, 2,97 h; Mancebo, 2011), ibafloxacino (3,76 h; Marín y cols., 2007b), enrofloxacino (0,73 h y 1,13 h; Rao y cols., 2001, 2002), ciprofloxacino (2,72 h: García Ovando, 2000). Orbifloxacino (4,12 h; Marín y cols., 2007a), difloxacino (6,3 h y 4,92 h; Atef y cols., 2002; Marín y cols., 2007c), y para pefloxacino (1,6 h; Abd El-Aty y Goudah, 2002), También se han encontrado valores de semivida superiores a los de nuestro estudio, como ocurre con ofloxacino, cuyo valor es de 15,55 h (Baruah y cols., 2004).

Comparando con los de otras especies animales, el $t_{1/2\lambda,z}$ del presente estudio, es inferior al obtenido cuando se administró marbofloxacino a perros, gatos, burros, caballos y cerdos: 10,80 h, 7,98 h, 8,80 h, 7,56 h y 7,94 h, respectivamente (Lefebvre y cols., 1998; Alabarellos y cols., 2005, González y cols., 2007; Bousquet-Mélou y cols., 2002, Ding y cols., 2010)). Sin embargo, estudios realizados en ovejas señalan valores de $t_{1/2\lambda,z}$ inferiores a los obtenidos en nuestro estudio: 2,06 y 3,96 h (Shem-Tov y cols., 1997, Sidhu y cols., 2010) En todos los casos se administró la misma dosis de 2 mg/kg.

En otras especies animales estudiadas el valor de $t_{1/2\lambda,z}$ fue inferior o similar al obtenido en nuestro estudio: 4,23 y 4,60 h en terneros (Alibadi y cols., 2002; Ismail y cols., 2007), en terneros (búfalo) 6,22 h y 4,60 (Lüders y cols., 2012, Baroni y cols., 2007) y 5,78 y 6,50 h en conejos (Abo-El-Souud y cols., 2009, Álamo, 2012).

5.2.2.4.- ÁREA BAJO LA CURVA.

El área bajo la curva de niveles plasmáticos (AUC), es un parámetro que permite calcular el aclaramiento plasmático y la biodisponibilidad del fármaco tras su administración extravascular. Se calcula integrando, entre tiempo cero e infinito, la curva de concentración plasmática-tiempo, y puede hacerse tanto por análisis compartimental (a partir de la ecuación general del proceso) o por análisis no compartimental (métodos trapezoidal, logarítmico trapezoidal, o mixto, lineal en la fase ascendente y logarítmico en la fase descendente de la curva de concentración plasmática a partir de la curva experimental) como en este caso. Yamaoka y cols. (1978b) definen los momentos estadísticos para las curvas de concentración plasmática y el AUC corresponde al momento cero.

El valor de AUC obtenido para marbofloxacino en cabras es de 7119,67 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ (Tabla 4), este valor es inferior al obtenido por Waxman de 8440 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ (Waxman y cols., 2001) para el mismo fármaco en cabras. Respecto a valores de AUC obtenidos en otras especies tras la administración de marbofloxacino en las mismas condiciones de dosis y vía que en nuestro estudio, podemos destacar que se han encontrado valores superiores de 9990 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ en ovejas (Sidhu y cols., 2002), 9170 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ en terneros (búfalos) (Lüders y cols., 2011), 8260 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ y 19100 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ caballos (Bousquet-Mélou y cols., 2002, Carretero y cols., 2002), 11270 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ en burros (González, 2007), 12210 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ en conejos (Abo-El Sooud y cols., 2009), 22433,33 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ en perros (Lefebvre y cols., 1998), 22560 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ en cerdos (Ding y cols., 2010, en este estudio la dosis es de 2,5 mg/kg) y 23530 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ en gatos (Albarellos y cols., 2005)

En la cabra, con otras fluoroquinolonas, se han obtenido valores de AUC inferiores para enrofloxacino (0,24 veces, Rao y cols., 2002), pefloxacino (0,38 veces; Abd El-Aty y Goudah, 2002) y orbifloxacino (0,85 veces; Marín y cols., 2007a), similares para danofloxacino (1,05 veces; Escudero y cols., 2007, 1,003 veces Mancebo, 2011) y superiores para la mayoría de ellas: ciprofloxacino (1,43 veces, Garcia Ovando y cols., 2000), moxifloxacino (1,63 veces; Fernández-Varón y cols., 2006a), difloxacino (2,2 veces; Marín y cols., 2007c), ibafloxacino (2,3 veces; Marín y cols., 2007b), levofloxacino (3,3 veces, Goudah y cols., 2008) y ofloxacino (8,2 veces, Baruah y cols., 2004). Las dosis utilizadas fueron de 1,25 mg/kg para enrofloxacino, de 2,5 mg/kg para orbifloxacino, 4 mg/kg para levofloxacino, 5 mg/kg para difloxacino, moxifloxacino, y ofloxacino, de 6 mg/kg para danofloxacino, de 10 mg/kg para ciprofloxacino y pefloxacino y de 15 mg/kg para ibafloxacino.

5.2.2.5.- TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA.

El tiempo medio de residencia o MRT es un parámetro farmacocinético que tiene una significación similar al tiempo de semivida ya que equivale a la inversa de una constante de eliminación y se obtiene dividiendo el area bajo la curva tiempo-concentración plasmática (AUMC) entre el area bajo la curva (AUC). Ambas pueden areas pueden obtenerse por integración entre cero e infinito de las curvas compartimentales o bien como hemos señalado para el AUC mediante análisis no compartimental por medio del cálculo de las areas trapezoidales como es nuestro caso. Se corresponde con el momento estadístico uno (Yamaoka y cols., 1978b)

En el presente estudio se ha obtenido un valor de MRT de 2,94 horas (Tabla 4). Este resultado es prácticamente igual al obtenido tras la administración de difloxacino (3,59 h; Marín y cols., 2007c) y enrofloxacino en cabras (3,47 h; Titos, 2010). También es comparable al obtenido en un estudio realizado en cabras tras la administración de 40 mg/kg de enrofloxacino junto con probenecid (3,15 h; Rao y cols., 2002b). Otros estudios en cabras dan como resultado valores inferiores; 2,18 h para danofloxacino a 6 mg/kg (Mancebo, 2011), 2,73 h (Abo El-Sooud, 2003) y 0,97 h tras la administración de 2,5 mg/kg de enrofloxacino (Rao y cols., 2002a), y algo superiores cuando se administró una dosis de 5mg/kg pero en cabras angoras (4,13 h; Muammer y cols., 2001). El resultado obtenido en nuestro estudio también es comparable con el obtenido en ovejas (3,29 h; Shem-Tov y cols., 1997; 4,11 h; Sidhu y cols., 2010).

Valores de MRT muy superiores a los obtenidos en nuestro estudio se han señalado en 7,44 y 5,33 h en terneros (Alibadi y cols., 2002; Ismail y cols., 2007), 9,22 y 6,51 h en terneros (búfalos) (Lüders y cols., 2012, Baroni y cols., 2007) en caballos (5,96 h; Bousquet-Mélou y cols., 2002), burros (10,62 h; González, 2007), gatos (11,19 h; Alabarells y cols., 2005), perros (14,10 h; Lefebvre 1998) y conejos (8,41 h; Abo-El-Sooud y cols., 2009).

En cuanto a otras fluoroquinolonas estudiadas en cabras, se han obtenido de MRT superiores para danofloxacino (5,39 h; Aliabadi y Lees, 2001) y ofloxacino (22,47 h; Baruah y cols., 2004), e inferiores para pefloxacino (1,07 h; Abd El-Aty y cols., 2002), ibafloxacino (1,50 h; Marín y cols., 2007b; dosis de 15 mg/kg), moxifloxacino (1,81 h; Fernández-Varón y cols., 2006a) y orbifloxacino (2,75 h; Marín y cols., 2007a, dosis de 2,5 mg/kg).

5.2.2.6.- ACLARAMIENTO PLASMÁTICO.

El aclaramiento plasmático (Cl) puede calcularse a partir de las curvas de niveles plasmáticos, recurriendo a métodos modelo-dependientes, basados en los modelos compartimentales y fisiológicos, o utilizando métodos modelo-independientes basados en la estimación del AUC (Doménech y cols., 1997). En nuestro estudio, se ha calculado el Cl en función del área bajo la curva mediante análisis no compartimental. El valor obtenido ha sido de 0,29 L/kg/h (Tabla 4) que es muy similar al obtenido por Waxman y cols. (2001 y 2003) de 0,23 y 0,24 L/kg/h, respectivamente.

Se han encontrado valores próximos a los descritos por nosotros en otros animales. Así, se obtuvieron valores de Cl de 0,20 L/kg/h en terneros (búfalos) (Lüders y cols., 2011) y en

conejos (Abo-El Sooud y cols., 2009), en terneros de 0,21 L/kg/h (Alibadi y cols., 2002), y en caballos de 0,25 L/kg/h (Bousquet-Mélou y cols., 2002).

Se han señalado valores inferiores para otras especies, con valores de 0,090 L/kg/h para gatos (Albarellos y cols., 2005), de 0,096 L/kg/h en perros (Lefevbre y cols., 1998) y de 0,10 L/kg/h en burros (González 2007), y superiores en oveja con 0,48 L/kg/h (Sidhu y cols., 2010).

Estudios con otras fluoroquinolonas en cabras señalan valores inferiores para ofloxacino, 0,14 L/kg/h (Baruah y cols., 2004) y para levofloxacino 0,18 L/kg/h (Goudah y cols., 2008), similares para enrofloxacino (0,235 L/kg/h Titos 2010) y difloxacino (0,32 L/kg/h; Marín y cols., 2007c), pero superiores para el resto: 0,4 L/kg/h para moxifloxacino y orbifloxacino (Fernández-Varón y cols., 2006a; Marín y cols., 2007a), 0,57 y 0,75 L/kg/h para danofloxacino (Aliabadi y Lees, 2001, Mancebo 2011), 1,05 L/kg/h para ibafloxacino (Marín y cols., 2007b), 1,18 L/kg/h para ciprofloxacino (García Ovando y cols., 2000) y 3,6 L/kg/h para pefloxacino (Abd El-Aty y Goudah, 2002).

5.2.2.7.- VOLÚMENES DE DISTRIBUCIÓN APARENTE.

Hemos obtenido tres valores de los volúmenes de distribución aparente para marbofloxacino (tabla 4), el correspondiente al compartimento central ($V_c = CL/k_{10}$), el obtenido en función del área o de AUC ($V_z = CL/AUC$) y el obtenido en estado estacionario ($V_{ss} = CL \times MRT$). El volumen de distribución en el compartimento central corresponde al compartimento desde el que se elimina el fármaco y que en nuestro caso alcanza un valor medio de 0,52 L/kg. Siempre es menor que cualquiera de los otros dos que son volúmenes de distribución totales del organismo, el de distribución en estado estacionario (V_{ss}) adquiere un valor de 0,85 L/kg, en tanto que el de distribución aparente en función del área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo (V_z), alcanza un valor de 2,57 L/kg. Como se puede observar estos valores indican que el fármaco tiene una excelente distribución en tejidos y fluidos en la especie objeto de nuestro estudio. Las diferencias obtenidas entre los volúmenes de distribución son consecuencia de los métodos empleados para su cálculo que ya hemos señalado. En general, el volumen de distribución es útil para transformar concentraciones en cantidades de fármaco en el organismo y viceversa. El V_{ss} es válido en aquellos momentos en que la curva de nivel plasmático está en zonas próximas a la inflexión y, por supuesto, durante la misma ($V_{ss} = V_c + V_p$) al considerar un equilibrio estacionario en la distribución, en tanto que el V_z es válido en una zona más amplia de la curva

de nivel plasmático y, de alguna manera, minusvalora la fase inicial ya que asume una pérdida de fármaco en función de V_z , colapsando a lo que sería equivalente a un modelo monocompartimental (Doménech y cols., 1997).

No todas las publicaciones señalan estos tres volúmenes de distribución aparente, siendo tal vez el V_{ss} el que más aparece. Así, Waxman y cols. (2001, 2003 y 2004), tras la administración de la misma dosis de 2 mg/kg, en cabras señalan valores de 1,31, 1,19 y 1,31 L/kg, respectivamente, para el V_{ss} .

Otros estudios realizados con marbofloxacino han descrito valores de V_z para otras especies animales, aunque son inferiores a los presentados en nuestro estudio, concretamente en terneros 1,2 L/kg (Alibadi y cols., 2002), terneros (búfalos) 1,8 L/kg (Lüders y col., 2012), caballos 2,83 L/kg (Bousquet-Mélou y cols., 2002), y ovejas 2,59 L/kg (Sidhu y cols., 2010).

Estudios de otras fluoroquinolonas en cabras han señalado valores de V_z inferiores para moxifloxacino (1,44 L/kg, Fernández-Varón y cols., 2006a) y enrofloxacino (1,29 L/kg, Rao y cols., 2000, 3,68 L/kg Titos 2010) y superiores para danofloxacino (7,87 L/kg, Escudero y cols., 2007) e ibafloxacino (5,86 L/kg, Marín y cols., 2007b). Importante es resaltar que el ibafloxacino fue administrado, a cabras, a una dosis de 15 mg/kg.

En relación al volumen de distribución en el estado estacionario (V_{ss}), se han señalado valores similares o ligeramente superiores a los presentados en nuestro estudio para diferentes especies animales. En ellas se han observado valores cercanos a 1L/kg en el caso de ovejas (1,09 L/kg, Sidhu y cols., 2010), 1,65 L/kg para terneros (búfalos) (Lüders y cols., 2011), 1,01 L/kg para gatos (Albarellos y cols., 2005), 1,3 L/kg en perros (Lefebvre y cols., 1998), 1,17 y 1,48 L/kg en caballos (Carretero y cols., 2002, Bousquet-Mélou y cols., 2002), 1,15 en burros (González, 2007), 1,65 y 1,99 L/kg en conejos (Abo-El Sooud y cols., 2009, Álamo, 2012) y 1,3 L/kg en cerdos (Ding y cols., 2010).

Respecto a otras fluoroquinolonas en cabras, Fernández-Varón y cols. (2006a), obtuvieron un valor inferior de V_{ss} (0,79 L/kg) para moxifloxacino, mientras que los valores publicados para otras fluoroquinolonas estudiadas han sido del mismo orden de magnitud: 1,13 L/kg para orbifloxacino (Marín y cols., 2007a), 1,16 L/kg para difloxacino (Marín y cols., 2007c), 1,31 L/kg para el marbofloxacino (Waxman y cols., 2001), 1,65 L/kg para ibafloxacino (Marín y cols., 2007b), y superiores de 2,85 L/kg para ofloxacino (Baruah y cols., 2004), 3,02 L/kg y 1,6 L/kg para danofloxacino (Aliabadi y Lees, 2001, Mancebo, 2012), 3,37 L/kg para

ciprofloxacino (García Ovando y cols., 2000), y 5,14 L/kg para pefloxacino (Abd El-Aty y Goudah, 2002). Estos valores demuestran que las quinolonas se distribuyen ampliamente en tejidos.

5.3.- ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA DE MARBOFLOXACINO EN CABRAS.

5.3.1.- MODELO FARMACOCINÉTICO.

La evolución de las concentraciones plasmáticas de marbofloxacino, tras la administración subcutánea de 2 mg/kg en cabras (tabla 5), se ha ajustado, igual que tras la administración intravenosa, a un modelo bicompartimental abierto pero en este caso con absorción de primer orden. Como en el caso anterior se han ponderado los datos con respecto a los inversos de los cuadrados de las concentraciones. En todos los casos estudiados el valor de AIC indica un mejor ajuste a este modelo bicompartimental abierto (trixponencial).

Igual que en la administración intravenosa, y tras un análisis de la varianza no paramétrico (tabla 6), se ha verificado la homogeneidad de los datos obteniéndose que, la única fuente de variación, es el tiempo y no los animales por lo que se manifiesta homogeneidad en las concentraciones a un tiempo determinado para todos los animales.

En la literatura no existen estudios compartimentales en cabras tras la administración de marbofloxacino vía subcutánea. El único estudio encontrado realiza un análisis no compartimental de las concentraciones plasmáticas (Waxman y cols., 2007).

El modelo bicompartimental hallado en nuestro estudio se ha obtenido también tras la administración subcutánea a cabras de otras fluoroquinolonas. Es el caso de orbifloxacino (Marín y cols., 2007a), difloxacino (Marín y cols., 2007b), enrofloxacino (Titos, 2010) y danofloxacino (Mancebo, 2011)

Diferentes estudios realizados cabras por vía subcutánea han dado como resultado un ajuste a un modelo monocompartimental para moxifloxacino (Fernández-Varón y cols., 2006a). En otras especies, y para marbofloxacino, se han encontrado buenos ajustes a modelos bicompartimental abierto en conejos (Álamo 2012), y tricompartmental en caballos (Bousquet-Mélou y cols., 2002). Otros estudios, también con marbofloxacino en otras especies animales muestran sólo análisis no compartimentales.

Cuando se administra un fármaco por vía extravascular (oral, intramuscular, subcutánea, transdérmica, etc.) el modelo bicompartimental puede esquematizarse como se indica en la

figura 2, en la cual se considera la variación instantánea de concentración en el compartimento central:

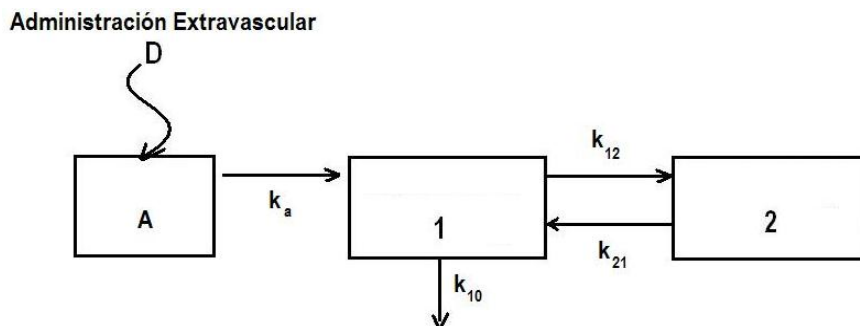


Figura 2.- Representación esquemática del modelo bicompartimental tras la administración extravascular de un fármaco.

Este modelo consta de dos compartimentos con una zona de depósito del fármaco (zona A) desde la que se produce la absorción. El modelo bicompartimental abierto tras la administración de una dosis subcutánea, viene definido por la siguiente ecuación:

$$C = C_1 \cdot e^{-\lambda_1 \cdot t} + C_2 \cdot e^{-\lambda_2 \cdot t} - C_a \cdot e^{-k_a \cdot t} \quad (6)$$

Dicha ecuación adquiere valores distintos en cada animal, los cuales se muestran en la Tabla 7 junto con sus valores medios y estadísticos de desviación.

Por tanto, la ecuación que describe la evolución de las concentraciones plasmáticas de marbofloxacino, tras su administración subcutánea, obtenida con los parámetros medios, adopta el siguiente valor:

$$C = 8526,83 \cdot e^{-0,57 \cdot t} + 208,36 \cdot e^{-0,10 \cdot t} - 8735,19 \cdot e^{-1,42 \cdot t} \quad \mu\text{g} / \text{L} \quad (7)$$

La representación directa de las concentraciones medias experimentales para cada animal en escala semilogarítmica y para las concentraciones medias (Gráficos 3 y 4), pone de manifiesto que los niveles de marbofloxacino aumentan rápidamente durante la primera fase de absorción del fármaco alcanzando su máximo alrededor de las 0,75 – 1,5 horas, para descender rápidamente en la fase posterior, hasta las 12 horas aproximadamente y, a partir de este

momento disminuyen de forma más lenta, dando lugar a una tercera fase, que podría considerarse monoexponencial y que se mantiene hasta el final del proceso (hasta las 32 horas tras la administración). Este hecho se aprecia más claramente al observar la representación semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (Gráfico 4), en la cual tras la administración del fármaco vía subcutánea, con una cinética de absorción de primer orden, aparece una curva triexponencial, cuya fase terminal puede considerarse recta.

La transformación de esta recta semilogarítmica, en su ecuación exponencial correspondiente, desarrolla la expresión triexponencial ya indicada en la ecuación 7, siendo representativa cada exponencial de los procesos que sufre el fármaco: absorción, regida por la constante de absorción (k_a), disposición rápida, descrita por la constante de disposición rápida (λ_1), rige fundamentalmente los procesos de distribución, y la disposición lenta que viene dada por la constante de disposición lenta (λ_2), que rige los procesos de eliminación principalmente.

La ecuación 7 resulta válida para definir la evolución temporal de las concentraciones plasmáticas de marbofloxacino en cabras, tras su administración subcutánea. Sin embargo, esta ecuación no es válida, para el cálculo de los parámetros farmacocinéticos que caracterizan la evolución del fármaco en la cabra, ya que estos últimos vienen definidos por el estudio tras la administración intravenosa. Sin embargo, vamos a comentar algunos parámetros obtenidos de esta última ecuación, ya que pueden dar una información interesante.

5.3.2.- PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS.

Los parámetros farmacocinéticos obtenidos por análisis compartimental y no compartimental para marbofloxacino, se muestran en las Tablas 7 y 8 respectivamente, y van referidos a cada animal, junto con los valores medios y estadísticos asociados.

5.3.2.1.- TIEMPOS DE SEMIVIDA.

Al igual que en la vía intravenosa, se ha calculado el tiempo de semivida de las fases de disposición rápida ($t_{1/2\lambda_1}$) y de disposición lenta ($t_{1/2\lambda_2}$), considerado este último valor como tiempo de semivida del fármaco (Atkinson y Kushner, 1979; Gibaldi y Perrier, 1982). Estos valores son de 1,22 y 6,77 h, respectivamente (Tabla 7). Estos valores son ligeramente superiores, aunque muy similares, a los obtenidos tras la administración intravenosa, lo cual, puede ser indicativo de

que, *a priori*, el proceso de absorción, no se convierte en un factor limitante de la eliminación como en los modelos *flip-flop*.

En cabras, se han presentado valores del $t_{1/2\lambda,1}$ referentes a otras fluoroquinolonas. En estos estudios se obtuvieron valores superiores e inferiores de $t_{1/2\lambda,1}$, concretamente de 2,19 h para difloxacino y 1,10 h para orbifloxacino (Marín y cols., 2007c; Marín y cols., 2007a).

En cuanto al $t_{1/2\lambda,z}$, el valor obtenido en nuestro estudio es ligeramente superior al obtenido en otro estudio similar realizado en cabras, que señala un valor de 5,74 h (Waxman y cols., 2007), aunque en este caso los datos fueron ajustados únicamente a análisis no compartimental, lo cual podría justificar estas diferencias.

Valores de $t_{1/2\lambda,z}$ superiores se han obtenido en caballos, con un valor promediado de 10,41 h (Bousquet-Melou y cols., 2002) a igualdad de dosis, y similares en conejos (6,50 h Álamo, 2012) y terneros (búfalos) (6,20 h Lüders y cols., 2012) también a la misma dosis.

Respecto a otras fluoroquinolonas en cabras, se han registrado semividas superiores a las halladas en nuestro estudio; con difloxacino (7,33 h; Marín y cols., 2007c), e inferiores con orbifloxacino (4,99 h; Marín y cols., 2007a), danofloxacino (1,50 h y 4,09 h; Mancebo, 2011 y Escudero y cols., 2007) y moxifloxacino (2,98 h; Fernández-Varón y cols., 2006a). En otro estudio (Titos, 2010) se han obtenidos valores superiores de 14,42 h.

5.3.2.2.- TIEMPO MÁXIMO Y CONCENTRACIÓN MÁXIMA.

Otro parámetro a tener en cuenta tras la administración subcutánea es el tiempo en que se alcanza la concentración plasmática máxima o tiempo máximo ($T_{m\acute{a}x}$). El valor de este parámetro ha sido de 1,25 h (Tabla 7). El $T_{m\acute{a}x}$ es independiente de la dosis administrada, pero sí se modifica en función de la forma farmacéutica administrada y la vía de administración, ya que depende de la constante de absorción.

En el estudio realizado por Waxman y cols (2007) en cabras, se señala un valor de $T_{m\acute{a}x}$ de 1,25 h, numericamente igual al obtenido en nuestro caso. Este resultado ha sido superior al indicado para caballos, 0,72 h (Bousquet-melou y cols., 1998) y para conejos de 0,50 h (Álamo, 2012), sin embargo para otras fluoroquinolonas, estudiadas en cabras, se han encontrado valores superiores, para orbifloxacino (1,25 h; Marín y cols., 2007a), para danofloxacino (1,64 h;

Escudero y cols., 2007), para moxifloxacino (2,42 h; Fernández-Varón y cols., 2006a) y para difloxacino (3,37 h; Marín y cols., 2007c).

En cuanto a la concentración plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$), el valor obtenido para marbofloxacino en cabra, ha sido de 2114,95 $\mu\text{g/L}$ (Tabla 7). Waxman y cols. (2007), tras la administración de la misma dosis a cabras obtuvieron una $C_{m\acute{a}x}$ comparable de 1770 $\mu\text{g/L}$, y también comparable a la obtenida en conejos (1643 $\mu\text{g/L}$; Álamo 2012). Por el contrario, en caballos, también a igualdad de dosis, la $C_{m\acute{a}x}$ obtenida es, aproximadamente, la mitad, con un valor de 1070 $\mu\text{g/L}$ (Bousquet-Mélou y cols., 2002). Para otras fluoroquinolonas descritas en cabras, se han obtenido valores comparables de $C_{m\acute{a}x}$ con los de nuestro estudio, como ocurre con moxifloxacino (1804,23 $\mu\text{g/L}$; Fernández-Varón y cols., 2006a) y orbifloxacino (1850 $\mu\text{g/L}$; Marín y cols., 2007a), si bien las dosis fueron 5 y 2,5 mg/kg respectivamente. Por otro lado, se han obtenido $C_{m\acute{a}x}$ inferiores con difloxacino (1330 $\mu\text{g/L}$; Marín y cols., 2007c) y danofloxacino (1050 $\mu\text{g/L}$; Escudero y cols., 2007) con dosis de 6 mg/kg.

5.3.2.3.- CONSTANTE DE ABSORCIÓN Y SEMIVIDA DE ABSORCIÓN.

La ecuación 7 define la evolución de las concentraciones plasmáticas, tras la administración subcutánea de marbofloxacino en cabras. Las constantes de absorción y eliminación, que se extraen de dicha ecuación no son reales, sino aparentes. En este caso, la constante de absorción aparente (k_a) es 1,42 h^{-1} (Tabla 7) y la semivida asociada a la misma ($t_{1/2k_a}$) de 0,49 h.

Si comparamos el valor obtenido para $t_{1/2k_a}$ con el obtenido para $t_{1/2\text{IV}}$ intravenoso, que es 5,61 h (Tabla 3), podemos observar como este último es casi 23 veces mayor, lo que indica que la fase de absorción no condiciona la eliminación de marbofloxacino en la cabra.

Sólo se dispone de valores de k_a para marbofloxacino tras su administración subcutánea en caballos con un valor de 4,33 h^{-1} al que le corresponde un $t_{1/2k_a}$ de 0,116 h (Bousquet-Mélou y cols., 2002) y de 6,51 h^{-1} al que le corresponde un $t_{1/2k_a}$ de 0,11 h (Álamo, 2012). Como podemos observar, estos últimos valores son superiores e inferiores para k_a y $t_{1/2k_a}$ respectivamente, a los hallados en nuestro estudio, por lo que la absorción de marbofloxacino, tras su administración subcutánea, es mucho más rápida en caballos y conejos que en las cabras.

Por el contrario, en cabras y tras la administración subcutánea de difloxacino (Marín y cols., 2007c), de moxifloxacino (Fernández-Varón y cols., 2006a) y de enrofloxacino (Titos, 2010), a dosis de 5 mg/kg; de danofloxacino (Mancebo, 2011), a dosis de 6mg/kg y de orbifloxacino (Marín y cols., 2007a), a dosis de 2,5 mg/kg, el $t_{1/2ka}$ es de 2,19 h; 1,71 h; 2,28 h; 1,33 h y 0,63 h, respectivamente, por lo que la absorción de estas cinco fluoroquinolonas es más lenta.

5.3.2.4.- ÁREA BAJO LA CURVA Y BIODISPONIBILIDAD.

El AUC, obtenida tras la administración subcutánea, alcanza un valor de 8210,73 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ (Tabla 8). Este valor es muy similar al obtenido en el estudio de Waxman y cols. (2007), en el que, a igualdad de dosis, se obtiene un valor de 8150 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$. Por otro lado, en caballos, en igualdad de condiciones que en nuestro estudio, se obtiene un AUC prácticamente igual a la cabra (7940 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$; Bousquet-Mélou y cols., 2002).

El valor del AUC permite calcular la biodisponibilidad (F) del fármaco, tras la administración subcutánea, mediante la siguiente ecuación:

$$F\% = 100 \cdot \frac{AUC_0^{\infty}{}_{EV}/D_{EV}}{AUC_0^{\infty}{}_{IV}/D_{IV}} \quad (8)$$

Donde el subíndice *EV* hace referencia a las vías extravasculares empleadas, en nuestro la subcutánea en formulación convencional o SC.

La biodisponibilidad obtenida es muy elevada, del orden del 108,08% \pm 27,67 (Tabla 8), lo que indica que, posiblemente, todo el fármaco accede a la circulación sistémica.

En cabras, Waxman y colaboradores obtienen un valor de 96 % (calculado a partir de los datos obtenidos en sus publicaciones; Waxman y cols., 2001 y 2007), y en caballos Bousquet-Mélou y cols. (2002) obtuvieron un valor del 97,6 %.

Otras fluoroquinolonas estudiadas en cabras, tienen una biodisponibilidad similar, tras su administración subcutánea: 90,16% el difloxacino (Marín y cols., 2007c), 99,55% para danofloxacino (Mancebo, 2011) y 108,96% para orbifloxacino (Marín y cols., 2007a).

5.3.2.5.- TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA (MRT_{sc}) Y TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA DE ABSORCIÓN (MAT_{sc}).

El MRT_{sc} obtenido presenta un valor medio de 4,15 h (Tabla 8). Éste parámetro es 1,4 veces mayor que el descrito tras la administración intravenosa (2,05 h; Tabla 4). Esta circunstancia es la esperada dado que este tiempo medio de residencia engloba todos los procesos, tanto los de eliminación como los de absorción.

En cabras se han encontrado valores de MRT similares a los hallados en nuestro estudio para marbofloxacino a la misma dosis, concretamente de 4,80 h, (Waxman y cols., 2007), comparables con los obtenidos en conejo de 3,98 h (Álamo, 2012), pero inferiores a los obtenidos en terneros (búfalos) (8,83h Lüders y cols., 2012) y en caballos (8,66 h, Bousquet-Mélou y cols., 2002).

En la cabra, se obtienen valores inferiores para orbifloxacino (3,58 h; Marín y cols., 2007a) y pefloxacino (2,12 h; Abd El-Aty y Goudah, 2002), similares para danofloxacino (4,39 h; Mancebo, 2011 y 4,51 h; Escudero y cols., 2007), y superiores para moxifloxacino (6,15 h; Fernández-Varón y cols., 2006a), enrofloxacino (6,06 h; Titos, 2010) y difloxacino (7,26 h; Marín y cols., 2007c).

Las dosis utilizadas para algunas fluoroquinolonas fueron distintas a las utilizadas en nuestro estudio. Así, en el caso de orbifloxacino se administró una dosis de 2,5 mg/kg de peso, para moxifloxacino, difloxacino y enrofloxacino de 5mg/kg, para danofloxacino 6 mg/kg, y para pefloxacino 10 mg/kg. .

En la Tabla 8, se presentan los valores de MAT_{sc} junto a los de MRT_{sc} tras la inyección subcutánea; en tanto que el MRT intravenoso aparece en la Tabla 4. El valor del tiempo medio de residencia de absorción se obtiene mediante la diferencia entre el tiempo medio de residencia extravascular y el intravenoso ($MAT_{sc} = MRT_{sc} - MRT$). A la vista de los resultados obtenidos para cada uno de estos parámetros en los distintos animales, se puede apreciar como en todas las cabras el valor de MAT_{sc} es inferior al del MRT intravenoso. Si se consideran los valores medios obtenidos, el MRT intravenoso (2,95 h) resulta ser entorno a 2,43 veces superior al MAT_{sc} (1,21 h). También tras el estudio de estos parámetros parecer extraerse que la absorción, tras la administración subcutánea de marbofloxacino, no condiciona su eliminación, como ya señalamos al hablar del tiempo de semivida.

No se han encontrado descritos valores de MAT para marbofloxacino en cabras y en otros animales. Estudios con otras fluoroquinolonas en cabras han descrito valores de MAT similares para orbifloxacino a 6 mg/kg (0,89 h; Marín y cols., 2007a) y mayores a los encontrados en nuestro estudio en el caso de danofloxacino a 6 mg/kg (2,01 h; Escudero y cols., 2007 y 2,24 h; Mancebo, 2011), de enrofloxacino a 5mg/kg (2,3 h; Titos, 2010), de moxifloxacino (4,31 h; Fernández-Varón y cols., 2006a) y de difloxacino (3,67 h; Marín y cols., 2007c) administrados a 5 mg/kg, resultando ser estos últimos dos valores superiores a sus respectivos MRT intravenosos.

5.4.- ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA DE MARBOFLOXACINO EN SOLUCIÓN DEL POLÍMERO P407 AL 25% EN CABRAS.

5.4.1.- MODELO FARMACOCINÉTICO.

La evolución de las concentraciones plasmáticas de marbofloxacino, tras la administración subcutánea de 6 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% (en adelante formulación SC1) a cabras (tabla 9), se ha ajustado a un modelo bicompartimentalabierto con absorción de primer orden. En este caso también se han ponderado los datos con respecto a los inversos de los cuadrados de las concentraciones. En todos los casos estudiados, el valor del AIC nos indica que el mejor ajuste es al modelo bicompartimental abierto (trixponencial).

Como en casos anteriores, y tras un análisis de la varianza no paramétrico (tabla 10), se ha verificado la homogeneidad de los datos obteniéndose que, la única fuente de variación es el tiempo, por lo que se manifiesta homogeneidad a un tiempo determinado en las concentraciones para todos los animales.

Para nuestro conocimiento, en la literatura no existen estudios farmacocinéticos realizados con marbofloxacino en fórmulas de liberación retardada o controlada como es el caso de la formulación SC1. Hay descrito un estudio de moxifloxacino en conejos, el cual se administró subcutáneamente en solución del polímero P407 al 30%. En este estudio, el análisis farmacocinético realizado fue no compartimental (Cárceles y cols., 2006). Por otro lado, sí hemos encontrado referencias con otras fluoroquinolonas en cabras, Marín y cols. (2010a), Titos (2010) y Mancebo (2011) describieron la farmacocinética de la misma formulación en solución del polímero P407 al 25% con difloxacino, enrofloxacino y danofloxacino, respectivamente. En ambos estudios el modelo compartimental descrito para la formulación SC-P407 fue bicompartimental y en algunos casos tricompartmental Mancebo (2011).

El modelo bicompartimental abierto tras una dosis subcutánea (Figura 2), viene definido por la ecuación 6 (página 178) y adquiere valores distintos en cada animal (Tabla 11) y, por tanto, considerando los valores medios de los parámetros farmacocinéticos, la ecuación que mejor describe la evolución de las concentraciones plasmáticas de marbofloxacino en formulación SC1 en cabra, tras su administración subcutánea, es la siguiente:

$$C = 77123,00 \cdot e^{-0,33 \cdot t} + 101,25 \cdot e^{-0,04 \cdot t} - 87667,00 \cdot e^{-0,51 \cdot t} \quad \mu\text{g/L} \quad (9)$$

En los Gráficos 5 y 6, se representan las concentraciones individuales para cada animal en escala semilogarítmica, y las medias experimentales. Puede observarse como los niveles de marbofloxacino aumentan durante la primera fase de absorción del fármaco, descienden rápidamente en la fase posterior y, a partir de este momento disminuyen de forma más paulatina, dando lugar a una tercera fase, que podría considerarse monoexponencial y que se mantiene hasta el final del proceso (desde las 24 hasta las 48 horas tras la administración). Este hecho se aprecia más claramente al observar la representación semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (Gráfico 6).

La transformación de esta recta semilogarítmica, en su ecuación exponencial correspondiente, desarrolla la expresión triexponencial indicada en la ecuación 9, con tres fases exponenciales: absorción, regida por la constante de absorción (K_a), disposición rápida, descrita por la constante de disposición rápida (λ_1), rige fundamentalmente los procesos de distribución, y la disposición lenta que viene dada por la constante de disposición lenta (λ_2), que rige los procesos de eliminación.

5.4.2.- PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS.

Los parámetros farmacocinéticos obtenidos por análisis compartimental y no compartimental, de marbofloxacino en formulación SC1, se muestran en las Tablas 11 y 12. Todos los parámetros van referidos a cada animal y a sus valores medios y estadísticos asociados.

5.4.2.1.- TIEMPOS DE SEMIVIDA.

El tiempo de semivida de la fase de disposición rápida ($t_{1/2\lambda,1}$) para marbofloxacino ha sido de 2,21 h y el de la fase de disposición lenta ($t_{1/2\lambda,z}$), considerado como tiempo de vida media o semivida del fármaco (Atkinson y Kushner, 1979; Gibaldi y Perrier, 1982), ha sido de 14,26 h (Tabla 11).

El $t_{1/2\lambda,1}$ obtenido resulta ser casi 1,8 y 1,6 veces superior a los obtenidos tras la administración intravenosa y subcutánea sin polímero (Tablas 3 y 7). En cuanto al $t_{1/2\lambda,z}$, resulta ser casi tres veces superior al obtenido tras la administración intravenosa (5,61 h; Tabla 3), y casi el doble al obtenido tras la administración subcutánea sin polímero (6,89 h; Tabla 7). Esto puede ser indicativo de que el proceso de absorción, a diferencia de la administración subcutánea sin polímero, puede ser un factor limitante de estos procesos, principalmente del de eliminación.

Si comparamos la semivida obtenida al administrar marbofloxacino en formulación SC1, con los valores obtenidos en el caso de otras fluoroquinolonas administradas con la formulación SC1 en cabras, el aumento de la semivida respecto a las vías intravenosa y SC sin polímero fue, en el caso de difloxacino de 5,23 h (IV); 5,69 h (SC) y 32,36 h (SC1) (Marín y cols., 2010a), para enrofloxacino de 10,44 h (IV); 12,42 h (SC) y 19,97 h (SC1) (Titos, 2010), y para danofloxacino de 2,97 h (IV); 1,5 h (SC) y 8,26 h (SC1) (Mancebo, 2011). En nuestro caso, este incremento del parámetro para marbofloxacino, si bien es de similar magnitud (de 2 a 4 veces) es ligeramente inferior al observado con la misma formulación para las fluoroquinolonas anteriores.

5.4.2.2.- TIEMPO MÁXIMO Y CONCENTRACIÓN MÁXIMA.

El $T_{m\acute{a}x}$ ha resultado ser 3,0 h (Tabla 11). Si lo comparamos con el $T_{m\acute{a}x}$ obtenido en la vía subcutánea sin polímero (1,08 h; Tabla 7), resulta ser casi tres veces superior.

Un valor algo superior, concretamente de 4,92 h, se obtuvo en conejos cuando se administró moxifloxacino en solución del polímero P407 al 30%, que resultó ser unas 6 veces superior al obtenido sin polímero por vía subcutánea (Cárceles y cols., 2006). Lo mismo puede decirse para la administración de enrofloxacino por vía subcutánea en solución SC1 en cabras, resultando un valor de $T_{m\acute{a}x}$ de 4,03 h (Titos, 2010) y para difloxacino de 3,6 horas (Marín y cols.,

2010a). Para danofloxacin, en la misma formulación, se obtuvo un valor inferior de 1,42 h (Mancebo, 2011)

La $C_{m\acute{a}x}$, obtenida para marbofloxacin en formulación SC1 en cabra, ha sido de 2730,08 $\mu\text{g/L}$ (Tabla 11), muy similar a la $C_{m\acute{a}x}$ alcanzada tras la administración subcutánea sin polímero (2157,15 $\mu\text{g/L}$; Tabla 7). Teniendo en cuenta que la administración de marbofloxacin junto con polímero se hizo a una dosis tres veces superior (6 mg/kg, en lugar de 2 mg/kg), así, el valor obtenido resulta un tercio inferior a lo esperado. Sin embargo, ha de tenerse en cuenta que la formulación es distinta, y que las fases de ingreso pueden ser diferentes (liberación y absorción).

En el estudio realizado en conejos por Cárceles y cols. (2006), en el que se administró una dosis de 30 mg/kg de moxifloxacin en solución del polímero P407 al 30%, se obtuvo una $C_{m\acute{a}x}$ inferior a la nuestra concretamente de 1830 $\mu\text{g/L}$, concentración similar a la hallada cuando se administró moxifloxacin sin polímero (1610 $\mu\text{g/L}$).

Para otras fluoroquinolonas administradas en cabras con la misma formulación SC1, el valor de $C_{m\acute{a}x}$ obtenido fue similar para enrofloxacin con 2935,74 $\mu\text{g/L}$ (15 mg/kg, Titos, 2010) y para difloxacin con 2970 $\mu\text{g/L}$ (15 mg/kg, Marín y cols., 2010a), pero inferior al obtenido con danofloxacin de 4260 $\mu\text{g/L}$ (18mg/kg, Mancebo, 2011)

En nuestro experimento la concentración inicial alcanzada por vía intravenosa, de 5221,20 $\mu\text{g/L}$, a una dosis de 2 mg/kg, es aproximadamente 1,35 veces superior a las concentraciones máximas experimentales alcanzadas cuando se administró una dosis de 6 mg/kg junto con polímero vía subcutánea.

5.4.2.3.- CONSTANTE DE ABSORCIÓN Y SEMIVIDA DE ABSORCIÓN.

Tras la administración de marbofloxacin en formulación SC1 a cabras, se ha obtenido un valor aparente de la constante de absorción (k_a) de 0,51 h^{-1} (Tabla 11) y de la semivida asociada a la misma ($t_{1/2ka}$) de 1,57 h (Tabla 11). Si los comparamos con los valores de k_a y de $t_{1/2ka}$ obtenidos tras la administración subcutánea sin polímero; 1,86 h^{-1} y 0,40 h (Tabla 7), podemos observar como la absorción es 4,3 veces más lenta cuando se administra el fármaco en formulación SC1. De ahí las propiedades del polímero en retardar la liberación del fármaco y por tanto en alcanzar la circulación sanguínea más lentamente.

Para la misma formulación SC1 en cabras, con enrofloxacin (Titos, 2010), se obtuvieron unos valores de k_a de $0,31 \text{ h}^{-1}$ y de $t_{1/2ka}$ de 2,28 h, mientras que por vía subcutánea sin polímero fueron de $k_a = 0,46 \text{ h}^{-1}$ y de $t_{1/2ka} = 1,52 \text{ h}$. Para danofloxacin (Mancebo, 2011) se obtuvieron valores de k_a de $0,55 \text{ h}^{-1}$, y un $t_{1/2ka}$ de 1,34 h, mientras que por vía subcutánea sin polímero fueron de $k_a = 0,55 \text{ h}^{-1}$ y de $t_{1/2ka} = 1,33 \text{ h}$. Podemos observar como la absorción es 1,5 veces más lenta para enrofloxacin cuando se administra el fármaco en formulación SC1, pero similar cuando se utiliza danofloxacin.

5.4.2.4.- ÁREA BAJO LA CURVA Y BIODISPONIBILIDAD.

El valor de AUC, obtenido tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg de marbofloxacin en formulación SC1, fue de $20919,66 \mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ (Tabla 12). Muy similar al obtenido para danofloxacin, en cabras, a la dosis de 18 mg/kg en la formulación SC1 (Mancebo, 2011), de $21540 \mu\text{g}\cdot\text{h/L}$. Sin embargo para enrofloxacin, y difloxacin, administrados en formulación SC1 a una dosis de 15 mg/kg cada uno (Titos, 2010, Marin y cols., 2010a), los valores alcanzados fueron muy superiores, $37483,41 \mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ y $41500 \mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ respectivamente.

Comparada con las vías subcutánea sin polímero e intravenosa, el AUC es 2,6 y 2,9 veces mayor respectivamente, teniendo en cuenta que se ha administrado una dosis tres veces superior con la formulación SC1.

La biodisponibilidad obtenida ha sido del 101,58 % ($\pm 15,87$, Tabla 12). Como podemos observar, la asociación del polímero no parece afectar a la biodisponibilidad, ya que el valor obtenido cuando se administró el fármaco por vía subcutánea sin polímero fue del 108,08% (Tabla 8), reduciéndose menos de un 5% si se compara con la vía con la vía intravenosa. La disminución de la biodisponibilidad si se detecta, sin embargo, en el estudio realizado en conejos cuando se utilizó el polímero P407 al 30% junto con moxifloxacin tras su administración subcutánea (Cárceles y cols., 2006), y en cabras, con la misma formulación SC1, para enrofloxacin (55,81%, Titos, 2010), difloxacin (72,58%, Marín y cols., 2010a), y danofloxacin (89,20%, Mancebo, 2011)

5.4.2.5.- TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA (MRT_{SC1}) Y TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA DE ABSORCIÓN (MAT_{SC1}).

El valor medio del MRT_{SC1} alcanza un valor de 9,14 h (Tabla 12). Este parámetro es 2,51 veces mayor al descrito tras la administración intravenosa (2,94 h; Tabla 3). Igualmente, es casi 1,85 veces superior al obtenido vía subcutánea sin polímero (4,15 h; Tabla 7).

En la Tabla 12, se presentan los valores correspondientes a los MRT_{SC1} y el tiempo medio de absorción (MAT_{SC1}) subcutáneos cuando se administró marbofloxacino en formulación SC1; en tanto que el MRT intravenoso aparece en la Tabla 4. A la vista de los resultados obtenidos para cada uno de estos parámetros en los distintos animales, se puede apreciar como todos los animales, excepto la cabra 2, presentan un valor de MAT_{SC1} superior al MRT intravenoso. Si se consideran los valores medios obtenidos, resulta que el MAT_{SC1} en formulación SC1 (6,20 h) resulta entorno a 2,10 veces superior al MRT intravenoso (2,94 h). De ello se concluye que, en principio, la absorción, tras la administración subcutánea de marbofloxacino en formulación SC1, puede comportarse como factor limitante de la eliminación.

5.5.- ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA DE MARBOFLOXACINO EN SOLUCIÓN DEL POLÍMERO P407 AL 25% + CARBOXIMETILCELULOSA AL 2% EN CABRAS.

5.5.1.- MODELO FARMACOCINÉTICO.

La evolución de las concentraciones plasmáticas de marbofloxacino, tras la administración subcutánea de 6 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (en adelante formulación SC2) a cabras (tabla 13), se ha ajustado a un modelo bicompartimentalabierto con absorción de primer orden. Como en los casos anteriopres también se han ponderado los datos con respecto a los inversos de los cuadrados de las concentraciones. En todos los casos estudiados, el valor del AIC nos indica que el mejor ajuste es al modelo bicompartimental abierto (triexponencial).

También se ha verificado la homogeneidad de los animales (tabla 14) mediante el test de Kruskal-Wallis obteniéndose que, el tiempo es la única fuente de variación, por lo que se manifiesta las concentraciones a cada tiempo de extracción en los animales son homogéneas.

Para nuestro conocimiento, en la literatura no existen estudios farmacocinéticos realizados con marbofloxacino en fórmulas de liberación retardada como es el caso de la

formulación SC2, pero este resultado concuerda con lo que hemos encontrado con la formulación SC1. Un estudio con una formulación de moxifloxacino con P407 al 30%, es el ya comentado de Cárceles y cols., (2006) en conejos, pero realizan un análisis no compartimental. Si las hemos encontrado con otras fluoroquinolonas en cabras, enrofloxacino (Titos, 2010), danofloxacino (Mancebo, 2011) y difloxacino (Escudero y cols., 2011), donde realizan análisis compartimental y no compartimental.

Para hallar la ecuación que mejor define la evolución de las concentraciones plasmáticas de marbofloxacino en la cabra, se deben llevar a cabo estudios estadísticos que permitan calcular los valores medios para cada uno de los parámetros que intervienen en la misma. De este modo, los parámetros calculados para cada animal, junto con los estadísticos correspondientes, deducidos a partir de las concentraciones plasmáticas experimentales, se muestran en la Tabla 15, y en la ecuación 10 se define la evolución de las concentraciones plasmáticas experimentales, en la cabra tras la administración subcutánea, de una dosis única de 6 mg/kg de marbofloxacino en formulación SC2 en cabra, adquiere el siguiente valor:

$$C = 29163,40 \cdot e^{-0,29 \cdot t} + 58,47 \cdot e^{-0,05 \cdot t} - 64248,00 \cdot e^{-0,40 \cdot t} \quad \mu\text{g} / \text{L} \quad (10)$$

El Gráfico 7, representa las concentraciones individuales para cada animal en escala semilogarítmica. Puede observarse como los niveles de marbofloxacino aumentan durante una primera fase (absorción del fármaco), descienden rápidamente en la fase posterior y, a partir de este momento disminuyen de forma más paulatina, en una tercera fase, que podría considerarse monoexponencial y que se mantiene hasta el final del proceso (hasta las 48 horas tras la administración). Este hecho se aprecia más claramente al observar la representación semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (Gráfico 8).

La transformación de esta recta semilogarítmica, en su ecuación exponencial correspondiente, desarrolla la expresión triexponencial indicada en la ecuación 10, con tres fases exponenciales: absorción, regida por la constante de absorción (K_a), disposición rápida, descrita por la constante de disposición rápida (λ_1) y la disposición lenta que viene dada por la constante de disposición lenta (λ_2).

5.5.2.- PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS.

A continuación se van a comentar los parámetros farmacocinéticos más representativos de marbofloxacino en formulación SC2 tras su administración subcutánea a cabras. Los parámetros farmacocinéticos obtenidos por análisis compartimental para cada uno de los animales y para las concentraciones medias se muestran en las Tablas 15 y 16 para el modelo bicompartimental y el no compartimental, respectivamente.

5.5.2.1.- TIEMPOS DE SEMIVIDA.

Se ha calculado para marbofloxacino los tiempos de semivida de la fase de disposición rápida ($t_{1/2\lambda,1}$) y de la fase de disposición lenta ($t_{1/2\lambda,z}$), al igual que se hizo para la vía intravenosa y las subcutáneas anteriores. Estos valores son de 2,26 y 16,25 h, respectivamente (Tabla 15).

El $t_{1/2\lambda,1}$ (2,26 h) resulta ser casi 1,7 veces superior al obtenido tras la administración intravenosa. Si lo comparamos con las administraciones subcutáneas con y sin el polímero P407 podemos observar que el valor de $t_{1/2\lambda,1}$ es 1,02 y 1,50 veces superior, respectivamente. Por tanto, esta formulación SC2 de marbofloxacino no ralentiza el $t_{1/2\lambda,1}$ respecto a cuando se administra con la formulación SC1, pero sí a cuando se administra sin polímero.

En cuanto al $t_{1/2\lambda,z}$, el valor obtenido (16,25 h; Tabla 15) resulta ser 2,90 veces superior al obtenido tras la administración intravenosa (5,61 h, tabla 3). Igualmente, si la comparamos con las vías subcutáneas sin y con el polímero P407, el resultado es 1,7 y 1,14 veces superior. Esto puede ser indicativo de que el proceso de absorción, a diferencia de la administración subcutánea sin polímero, puede ser también un factor limitante de la eliminación.

Si comparamos la semivida obtenida al administrar marbofloxacino en formulación SC2, con los valores obtenidos en el caso de otras fluoroquinolonas administradas con la formulación SC2 en cabras, el aumento de este valor respecto a la vía intravenosa y SC sin y con polímero fue, en el caso de difloxacino de 5,23 h (IV); 5,69 h (SC); 32,36 h (SC1) y 35,19 h (SC2) (Marín y cols., 2010a, Escudero y cols., 2011), en el caso de enrofloxacino de 10,44 h (IV); 12,42 h (SC); 19,97 h (SC1) y 48,30 h (SC2) (Titos, 2010), y para danofloxacino fue de 2,97 h (IV); 1,5 h (SC); 8,26 h (SC1) y 7,47 h (SC2) (Mancebo, 2011). Por lo tanto, el alargamiento de la semivida esperado en el caso de marbofloxacino vuelve a ser sustancialmente menor al esperado,

teniendo en cuenta los resultados obtenidos con la misma formulación para otras fluoroquinolonas (sobre todo para enrofloxacino).

5.5.2.2.- TIEMPO MÁXIMO Y CONCENTRACIÓN MÁXIMA.

El $T_{m\acute{a}x}$ ha resultado ser 4,00 h (Tabla 15). Si lo comparamos con el $T_{m\acute{a}x}$ obtenido en la vía subcutánea sin polímero (1,08 h; Tabla 7), resulta ser casi 4 veces superior.

Un valor algo similar se encontró para la administración de enrofloxacino por vía subcutánea en solución SC2 en cabras, resultando un valor de $T_{m\acute{a}x}$ de 4,33 h (Titos, 2010) y para difloxacino de 2,9 horas (Escudero y cols., 2011). Para danofloxacino, en la misma formulación, se obtuvo un valor inferior de 2,33h (Mancebo, 2011)

La $C_{m\acute{a}x}$, obtenida para marbofloxacino en formulación SC2 en cabra, ha sido de 2065,75 $\mu\text{g/L}$ (Tabla 15), 1,3 veces inferior a la obtenida cuando se administró por vía subcutánea en formulación SC1 (2730,08 $\mu\text{g/L}$; Tabla 11); y similar a la $C_{m\acute{a}x}$ alcanzada tras la administración subcutánea sin polímero (2157,15 $\mu\text{g/L}$; Tabla 7), e inferior a la extrapolada por vía intravenosa (5221,20 $\mu\text{g/L}$; Tabla 3). Hay que tener en cuenta que la administración del fármaco con las formulaciones controladas SC1 y SC2 se hizo a una dosis de 6 mg/kg, 3 veces superior a cuando se administró sin polímero.

Para otras fluoroquinolonas administradas en cabras con la misma formulación SC2, el valor de $C_{m\acute{a}x}$ obtenido fue similar para enrofloxacino con 2037,22 $\mu\text{g/L}$ (15 mg/kg Titos, 2010), para difloxacino con 2670 $\mu\text{g/L}$ (15 mg/kg, Escudero y cols., 2011), y para danofloxacino con 2830 $\mu\text{g/L}$ (18mg/kg, Mancebo, 2011)

5.5.2.3.- CONSTANTE DE ABSORCIÓN Y SEMIVIDA DE ABSORCIÓN.

Tras la administración de marbofloxacino en formulación SC2 a cabras, se ha obtenido una constante de absorción aparente (k_a) de 0,40 h^{-1} y una semivida asociada a la misma ($t_{1/2ka}$) de 1,86 h (Tabla 15). Al comparar esta $t_{1/2ka}$ y k_a con las obtenidas tras la administración subcutánea de marbofloxacino en formulación SC1 (1,57 h y 0,51 h^{-1} ; Tabla 11) podemos observar la absorción es 0,78 veces más lenta. También existen diferencias al compararla con la $t_{1/2ka}$ y k_a cuando se administra el fármaco vía subcutánea sin el polímero P407 (0,49 h y 1,42 h^{-1} ;

Tabla 7), resultando en el caso que nos ocupa, una absorción aproximadamente 5,55 veces más lenta. Ello se debe a que esta formulación retarda la liberación del fármaco.

Para la misma formulación SC2 en cabras, con enrofloxacino (Titos, 2010), se obtuvieron unos valores de k_a de $0,33 \text{ h}^{-1}$ y de $t_{1/2ka}$ de 2,21 h, con la formulación SC1 fueron para k_a de $0,31 \text{ h}^{-1}$ y para $t_{1/2ka}$ de 2,28 h (similares), mientras que por vía subcutánea sin polímero fueron de $k_a = 0,46 \text{ h}^{-1}$ y de $t_{1/2ka} = 1,52 \text{ h}$. Para danofloxacino (Mancebo, 2011) se obtuvieron valores para k_a de $0,42 \text{ h}^{-1}$, y un $t_{1/2ka}$ de 1,68 h, mientras que por vía subcutánea con y sin polímero fueron de $k_a = 0,55 \text{ h}^{-1}$ y de $t_{1/2ka} = 1,33 \text{ h}$ y $k_a = 0,55 \text{ h}^{-1}$ y de $t_{1/2ka} = 1,34 \text{ h}$ (similares). Podemos observar como la absorción es más lenta para enrofloxacino cuando se administra el fármaco en formulación SC1 y SC2 (similares entre ellas), respecto a la subcutánea sin polímero. Para danofloxacino, sin embargo, la absorción es más lenta para la formulación SC2 respecto a la SC1 y subcutánea sin polímero (similares entre ellas). Para marbofloxacino, la absorción es más lenta para la formulación SC2 respecto a la SC1, y mucho menor respecto a la subcutánea sin polímero (5,5 veces inferior).

5.5.2.4.- ÁREA BAJO LA CURVA Y BIODISPONIBILIDAD.

El AUC, obtenida tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg de marbofloxacino en formulación SC2, alcanza un valor de $16441,85 \mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ (Tabla 16), ligeramente inferior al obtenido con la formulación SC1 ($2730,08 \mu\text{g}\cdot\text{h/L}$, Tabla 12) y casi dos veces superior al obtenido por vía subcutánea sin polímero ($8210,73 \mu\text{g}\cdot\text{h/L}$, Tabla 8) a una dosis tres veces inferior.

La biodisponibilidad obtenida ha sido del $78,64 (\pm 14,47)$, Tabla 16). Como podemos observar, la asociación al polímero P407 de la carboximetilcelulosa parece afectar a la biodisponibilidad obtenida cuando se administró el fármaco vía subcutánea en formulación SC1 $101,58 \% (\pm 15,87)$, Tabla 12). Lo mismo puede decirse si comparamos el valor descrito tras la administración vía subcutánea sin polímero $108,08\% \pm 11,00$ (Tabla 8).

Estos resultados indican que la biodisponibilidad obtenida parece afectarse por la utilización, o no, de la carboximetilcelulosa como aditivo al polímero por vía subcutánea para marbofloxacino, al igual que ocurre con otras fluoroquinolonas, donde si se detecta una disminución de la biodisponibilidad, en función de la formulación SC2 y SC1 respecto a la subcutánea sin polímero. Para enrofloxacino se obtienen unos valores para la formulación SC2,

SC1 y subcutánea sin polímero de 52, 83%, 55,81% y 71,00% (Titos, 2010), para difloxacino de 52,14% 72,58% y 81,74%, (Marín y cols., 2010a, Escudero y cols., 2011), y para danofloxacino de 73,04%, 89,20% y 99,55% (Mancebo, 2011).

5.5.2.5.- TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA (MRT_{SC2}) Y TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA DE ABSORCIÓN (MAT_{SC2}).

Por otro lado, el MRT_{SC2} alcanza un valor de 8,24 h (Tabla 16). Este parámetro es casi 2,8 veces mayor al descrito tras la administración intravenosa (2,95 h; Tabla 4). Igualmente, es casi 1,75 veces superior al obtenido vía subcutánea sin polímero (4,15 h; Tabla 8), y 0,9 veces superior al obtenido con el polímero P407 en la formulación SC1 (9,14 tabla 12).

En la Tabla 12, se presentan los valores correspondientes a los MRT_{SC2} y el tiempo medio de absorción (MAT_{SC2}) subcutáneos cuando se administró marbofloxacino en formulación SC2; en tanto que el MRT intravenoso aparece en las Tabla 4. A la vista de los resultados obtenidos para cada uno de estos parámetros en los distintos animales, se puede apreciar como todos los animales presentan un valor de MAT_{SC2} superior al MRT intravenoso. Si se consideran los valores medios obtenidos, el MRT intravenoso (2,95 h) resulta ser inferior al MAT_{SC2} subcutáneo tras la administración de marbofloxacino en formulación SC2 (5,30 h). De ello se concluye que, en principio, la absorción, tras la administración subcutánea de marbofloxacino en formulación SC2, puede comportarse como factor limitante de la eliminación, al igual que ocurre con la administración del fármaco vía subcutánea con polímero P407.

5.6.- COMPARACIÓN ENTRE ADMINISTRACIONES.

La disposición plasmática de marbofloxacino para todas las vías estudiadas, intravenosa y subcutáneas (en solución acuosa, en solución del polímero P407 al 25% o formulación SC1 y en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% o formulación SC2) se ajustan mejor a un modelo bicompartimental abierto, existiendo en las vías extravasculares una constante de absorción de primer orden.

Las representaciones gráficas de las concentraciones experimentales (Gráfico 9 y 10) sugieren diferencias en el comportamiento del antimicrobiano en cuanto a las fases de ingreso, ya sea administrado por vía subcutánea sin polímero, ya sea administrado en formulación SC1 o

SC2. Esto se refleja en un retraso de la absorción cuando se administra con alguna formulación de liberación retardada, lo cual influye en las fases de disposición, donde parece haber diferencias significativas en las pendientes de las curvas en las fases terminales. Pero para poder cuantificar esta afirmación es necesario comparar los parámetros farmacocinéticos obtenidos en cada caso, entre ellos, la semivida en la fase terminal $t_{1/2\lambda,z}$, el tiempo medio de residencia MRT, la constante de absorción k_a , la concentración máxima alcanzada por vía extravascular con su tiempo asociado C_{max} y T_{max} , el tiempo medio de absorción MAT, el área bajo la curva de niveles plasmáticos AUC y la biodisponibilidad F(%). La existencia de diferencias significativas se ha comprobado mediante un estudio estadístico no paramétrico (H de Kruskal-Wallis), cuyos resultados se muestran en la Tabla 18. Una vez realizada dicha prueba, se realiza una segunda prueba en aquellos parámetros que muestren diferencias significativas, utilizando la suma de rangos de Wilcoxon para muestras apareadas cuyos resultados se muestran en la tabla 19

5.6.1.- SEMIVIDA EN LA FASE TERMINAL ($t_{1/2\lambda,z}$).

Puede observarse en los valores presentados en la tabla 18 que existen diferencias significativas en los valores de la semivida ($p < 0,05$) entre la vía intravenosa y las vías subcutáneas cuando se administra el fármaco sin y con formulación SC1 o SC2. Tras estos resultados se realiza un segundo análisis mediante la suma de rangos de Wilcoxon (tabla 19), que indica que los valores de $t_{1/2\lambda,z}$ son similares para formulaciones convencionales entre sí y para las poliméricas entre sí, pero diferentes cuando se comparan entre ellas, tal y como cabría esperar.

La existencia de diferencias entre las semividas medias en la fase terminal para la vía intravenosa y las extravasculares con polímero P407 puede explicarse, posiblemente, porque la fase de absorción en estas últimas influye lo suficiente en la fase de eliminación del fármaco (factor limitante) lo que hace que este se elimine más lentamente (figura 3).

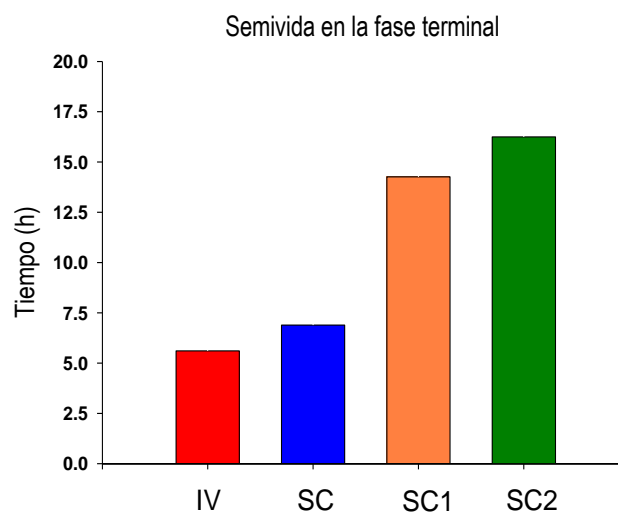


Figura 3.- Tiempos de vida media ($t_{1/2z}$) obtenidos en la cabra tras la administración de marbofloxacino vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC) a una dosis de 2 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 6 mg/kg.

5.6.2.- TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA (MRT).

El MRT se comporta de forma diferente a las semividas descritas anteriormente. Puede observarse en las tablas 18 y 19 la existencia de diferencias significativas entre ellos ($p < 0,05$). En la tabla 17 se observa que el MRT es mayor en las vías extravasculares respecto la vía intravenosa para las administraciones subcutáneas sin y con polímero en las formulaciones SC1 y SC2 respectivamente. Esto indica que la permanencia del fármaco es mayor tras la administración subcutánea y en las dos formulaciones de liberación retardada, y como las concentraciones plasmáticas parecen descender más lentamente en la fase terminal de la curva, tras estas administraciones (gráficos 9 y 10), puede ser que la fase responsable del incremento en el MRT sea la fase de ingreso (la absorción) y no la de eliminación (disposición).

A continuación (Figura 4), se presentan de forma gráfica los valores de MRT de la vía intravenosa y subcutánea con y sin polímero:

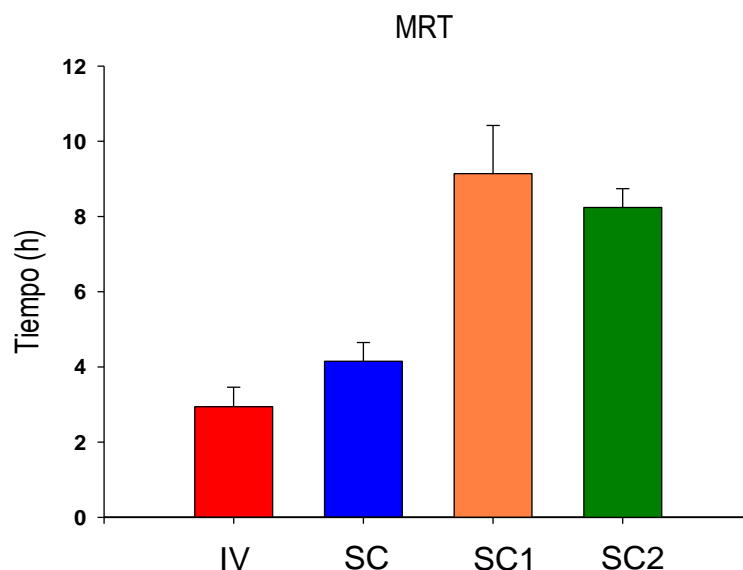


Figura 4.- Tiempo medio de residencia (MRT) obtenido en la cabra tras la administración de marbofloxacino vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC) a una dosis de 2 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 6 mg/kg.

5.6.3.- CONSTANTE DE ABSORCIÓN (Ka).

Cuando comparamos los resultados obtenidos en la administración subcutánea de marbofloxacino sin polímero con los obtenidos en las formulaciones retardadas (Tablas 18 y 19), se encuentran diferencias significativas ($p < 0,05$). Los valores medios de la constante de absorción en las diferentes vías y formas de administración de marbofloxacino en cabras se describen en la Tabla 17. Podemos observar que la velocidad de ingreso del fármaco (entendida como la suma de las velocidades de eliminación desde la zona de inyección, y de absorción desde dicho punto hasta la sangre, Toutain y cols., 2004a), será menor cuando se administra en formulación SC1 o SC2, de esta manera, la constante de absorción en la formulación convencional resulta 4,07 y 5,2 veces mayor que las formulaciones SC1 y SC2 respectivamente y la disminución es del orden de 0,24 y 0,19 veces respectivamente.

Comparado con los resultados obtenidos para enrofloxacino y danofloxacino (Titos, 2010, Mancebo, 2011), la disminución es del orden de 0,66 veces para la formulación SC1 y 0,65 veces para la formulación SC2 en el primero respecto a la subcutánea sin polímero, sin embargo, en el segundo, no hay diferencias para la formulación SC1, pero si para la SC2, del orden de 0,65 veces más lenta.

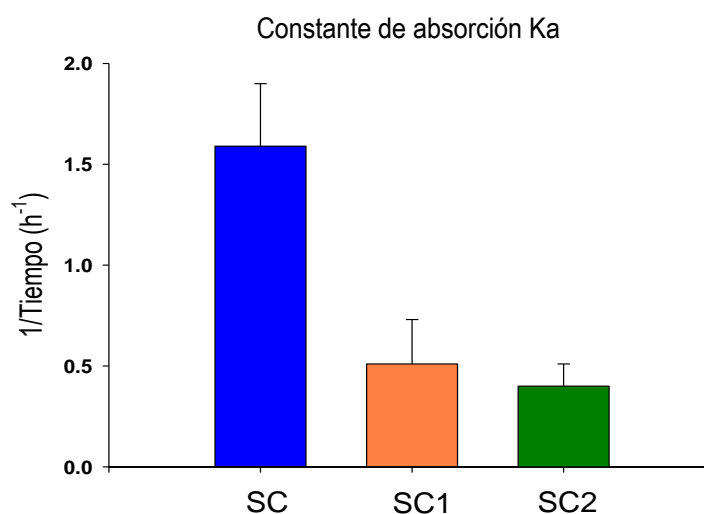


Figura 5.- Constante de absorción (k_a) obtenida en la cabra tras la administración de marbofloxacino vía subcutánea (SC) a una dosis de 2 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 6 mg/kg.

5.6.4.- TIEMPO MÁXIMO ($T_{máx}$) Y CONCENTRACIÓN MÁXIMA ($C_{máx}$).

En la Tabla 17 se muestran los valores de $T_{máx}$ y $C_{máx}$ de las tres formulaciones subcutáneas. Se puede apreciar (Tablas 18 y 19) que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores de los tiempos, pero no en los de las concentraciones ($p \geq 0,05$) con la formulación subcutánea convencional y las formulaciones retardadas. Como se puede observar, se obtienen similares $C_{máx}$ y un mayor $T_{máx}$ cuando se administra el fármaco en formulación SC1 y SC2 respectivamente.

El mayor valor de $T_{máx}$ medido cuando se administra marbofloxacino en las dos fórmulas de liberación retardada, indica que el ingreso de marbofloxacino debe ser más prolongado, lo que está, a su vez, de acuerdo con los valores obtenidos para la k_a . En la figuras 6 y 7, se observan las diferencias en el $T_{máx}$ y en la $C_{máx}$, respectivamente, para marbofloxacino en cabras, entre las tres vías de administración subcutáneas. Sin embargo, en la figura 7 se han incluido, además, los valores de $C_{máx}$ corregidos al mismo nivel de dosis que en la formulación convencional.

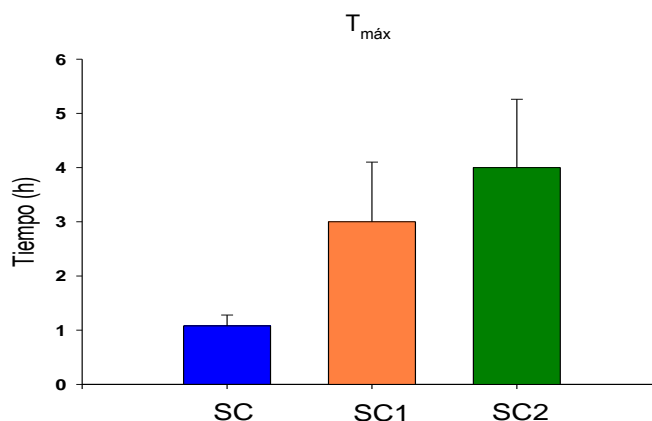


Figura 6.- Tiempo máximo ($T_{máx}$) obtenido en la cabra tras la administración de marbofloxacino vía subcutánea (SC) a una dosis de 2 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 6 mg/kg.

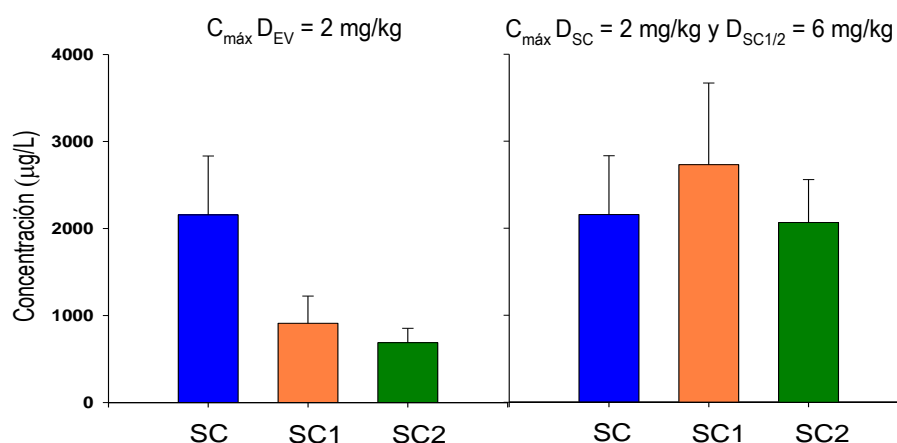


Figura 7.- Concentraciones plasmáticas máximas ($C_{máx}$) obtenidas en la cabra tras la administración de marbofloxacino vía subcutánea (SC) a una dosis de 2 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 6 mg/kg. A la izquierda los valores de $C_{máx}$ de marbofloxacino tras su administración vía SC1 y SC2, están corregidos a una dosis de 2 mg/kg*.

En la figura 7, parte derecha, podemos observar que no existen diferencias significativas entre los valores de $C_{máx}$ a 2 y 6 mg/kg para las formulaciones SC, SC1 y SC2 respectivamente, sin embargo, corregida esa diferencia de dosis, parte izquierda, si se observan diferencias entre la administración convencional y las dos de liberación retardadas (que siguen siendo similares entre sí).

5.6.5.- TIEMPO MEDIO DE ABSORCIÓN (MAT).

En cuanto al MAT, los valores medios obtenidos tras las administraciones subcutáneas (Tabla 17) son de 1,00 h para la formulación sin polímero, de 4,43 h cuando se administra en formulación SC1 y de 4,01 h tras la administración en formulación SC2. Estos valores resultan estadísticamente diferentes ($p < 0,05$), resultando inferior, en concordancia con lo expuesto anteriormente, el MAT obtenido en la formulación sin polímero, como se ve en la figura 8. Por ello la absorción parece ser más lenta tras la administración subcutánea en alguna de las formulaciones de liberación retardada. Como resultado de esta diferencia en el ingreso del fármaco, se obtienen valores de T_{max} superiores y k_a inferiores, pero no se alcanzan valores de $C_{máx}$ significativamente distintos, aunque si más mantenidos entre 1 y 6-8 horas para las formulaciones SC1 y SC2 respecto a la administración sin polímero (comparando las tablas 5, 9 y 13 respectivamente). Esto parece indicar un cierto equilibrio entre las fases de ingreso (liberación y absorción) y las de disposición (distribución y eliminación) en este intervalo de tiempo.

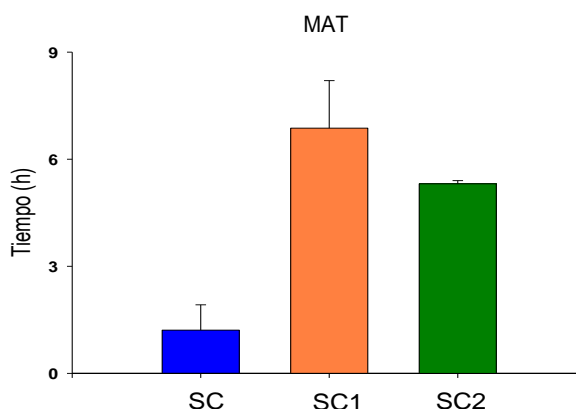


Figura 8.- Tiempo medio de absorción (MAT) obtenido en la cabra tras la administración de marbofloxacino vía subcutánea (SC) a una dosis de 2 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 6 mg/kg.

5.6.6.- ÁREA BAJO LA CURVA (AUC).

Las pruebas no paramétricas ponen de manifiesto la existencia de diferencias significativas en los valores de AUC obtenidos para marbofloxacino en cabra tras la vía intravenosa y subcutánea sin polímero, frente a las obtenidas con formulaciones SC1 y SC2 (Tablas 18 y 19). Si bien, los valores de AUC obtenidos con las dos formulaciones retardadas

son mayores que el AUC_{IV} , debemos tener en cuenta que, en parte, se debe a que se han empleado dosis 3 veces mayores para estas formulaciones de liberación controlada, por lo que al corregir esos AUC_{EV} a una dosis de 2 mg/kg resultan ser similares al AUC_{IV} .

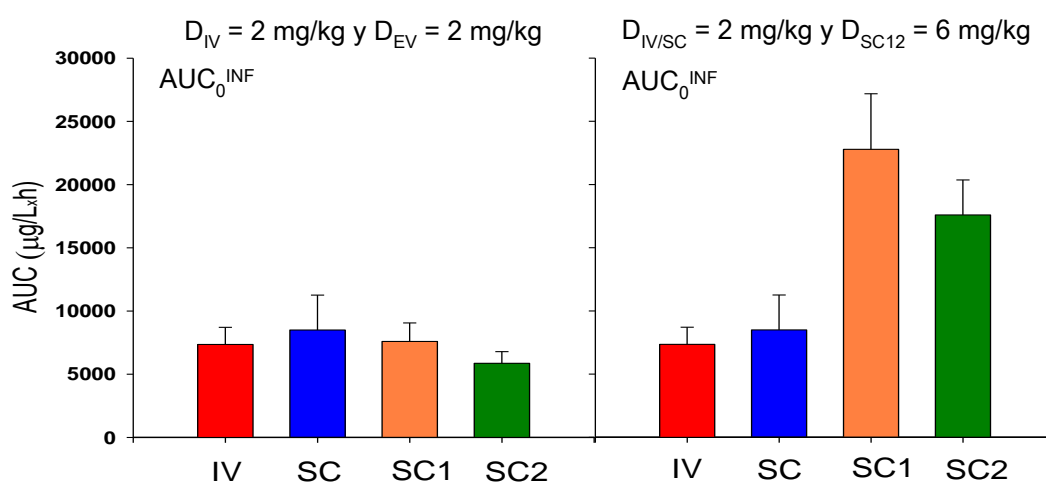


Figura 9.- Área bajo la curva de niveles plasmáticos (AUC) obtenidos en la cabra tras la administración de marbofloxacin vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC) a una dosis de 2 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 6 mg/kg. En la izquierda, los valores de $AUC_{0-\infty}$ de marbofloxacin tras su administración vía SC1 y SC2, están corregidos a una dosis de 2 mg/kg*.

Al comparar los valores de AUC (Figura 9, derecha), se puede apreciar que el AUC obtenido tras la administración subcutánea sin polímero es similar a la intravenosa, pero significativamente menor a los valores de AUC obtenidos al administrarlo en formulaciones retardadas. Cuando se corrigen, en función de la dosis (Figura 9, izquierda), no hay diferencias entre ellos.

Llegados a este punto conviene señalar que la utilización de una dosis tres veces superior en las administraciones con formulaciones poliméricas parece ser adecuada. En efecto, a igualdad de dosis (2 mg/kg) el valor de AUC prácticamente no se modifica (la disposición en plasma es muy similar), sin embargo, el valor de $C_{m\acute{a}x}$ varía considerablemente entre las administraciones extravasculares (figuras 7 y 9 izquierda). Por otro lado, cuando se administran las dos formulaciones poliméricas a dosis de 6 mg/kg, el valor de AUC varía considerablemente entre las administraciones extravasculares, pero el valor de $C_{m\acute{a}x}$ prácticamente no se modifica (figuras 7 y 9 derecha).

5.6.7. BIODISPONIBILIDAD (F).

La biodisponibilidad de marbofloxacinó calculada y corregida en función de la diferencia de dosis, resulta similar cuando se administra sin y con polímero tal y como se aprecia en la tabla 18. Estos resultados indican que dicho parámetro no parece afectarse por la utilización del polímero por vía subcutánea en el caso de marbofloxacinó, a diferencia de lo que ocurre con otras fluoroquinolonas, donde sí se detecta una disminución de la biodisponibilidad, en función de la formulación SC2 y SC1 respecto a la subcutánea sin polímero.

a) Enrofloxacinó SC2, SC1 y subcutánea de 52, 83%, 55,81% y 71,00% (Titos, 2010).

b) Difloxacinó SC2, SC1 y subcutánea de 52,14% 72,58% y 81,74%, (Marín y cols., 2010a, Escudero y cols., 2011).

c) Danofloxacinó SC2, SC1 y subcutánea de 73,04%, 89,20% y 99,55% (Mancebo, 2011).

d) Marbofloxacinó SC2, SC1 y subcutánea sin polímero de 78,64%, 101,58% y 108,08%.

En la figura 10, se observa de forma gráfica la no existencia de diferencias en la biodisponibilidad de las tres formulaciones subcutáneas, sin polímero P407, con polímero P407 y con polímero P407 + carboximetilcelulosa:

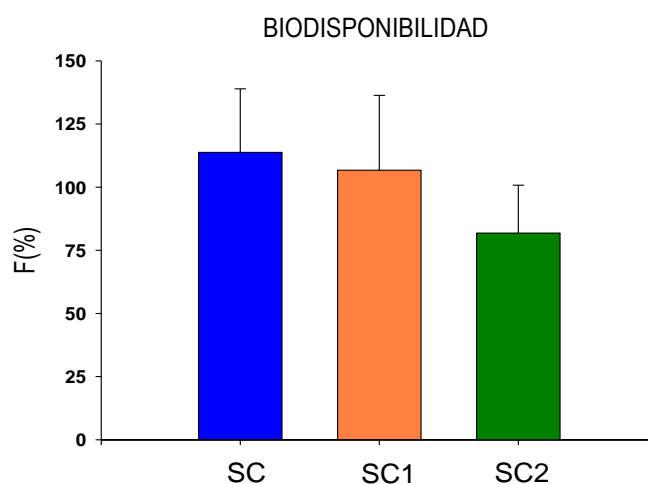


Figura 10.- Biodisponibilidad obtenida en la cabra tras la administración de marbofloxacinó vía subcutánea (SC) a una dosis de 2 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 6 mg/kg.

5.7.- ESTUDIO FARMACOCINÉTICO DE LA ABSORCIÓN EXTRAVASCULAR DE MARBOFLOXACINO MEDIANTE DECONVOLUCIÓN.

Se ha utilizado la técnica de deconvolución numérica para evaluar el proceso de absorción del fármaco tras su administración en las formulaciones SC, SC1 y SC2.

La deconvolución se utiliza en farmacocinética para obtener la función *unidad impulso respuesta*, que permite calcular la velocidad de absorción con la que el fármaco accede al compartimento central. Es una herramienta útil para conocer *in vivo* el acceso del fármaco desde la forma medicamentosa, vía extravascular, hasta el organismo.

Para realizar estos estudios, es necesario un conocimiento previo de la función de disposición y eliminación (generalmente una administración intravenosa expresada como $C_{(t)}$). Posteriormente, una vez conocida la función de entrada $C_{(t)}$ a estudiar (obtenida mediante administración extravascular), puede expresarse dicha función mediante la ecuación de convolución como: $C_{(t)} = f_{(t)} * C_{(t)}$

Donde $C_{(t)}$ y $C_{(t)}$ son conocidas, y para conocer la fase de absorción o ingreso $f_{(t)}$ debe realizarse la operación inversa a la convolución, llamada *deconvolución*, tal y como se muestra en la figura 11.

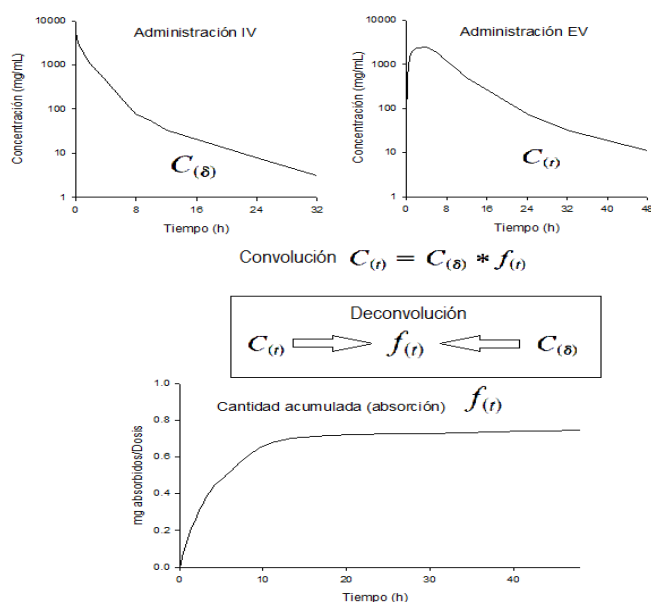


Figura 11.- Proceso de obtención de la fracción de fármaco que accede al compartimento central tras una administración extravascular mediante deconvolución.

Tras aplicar la técnica de deconvolución a las administraciones subcutáneas de marbofloxacino a dosis de 2, 6 y 6 mg/kg (SC, SC1 y SC2 respectivamente), se ha obtenido que la formulación convencional a dosis de 2 mg/kg alcanza una velocidad máxima de absorción de $106,42 \pm 38,76$ mg/h a las $0,48 \pm 0,23$ horas, mientras que las formulaciones poliméricas SC1 y SC2, a dosis de 6 mg/kg cada una, alcanzan velocidades máximas de $63,41 \pm 10,73$ y $50,07 \pm 13,87$ mg/h a $1,44 \pm 0,76$ h y $1,92 \pm 0,76$ horas, respectivamente. La velocidad de absorción de estas dos formulaciones es, aproximadamente, la mitad que la velocidad de la formulación convencional aún cuando se utiliza el triple de dosis.

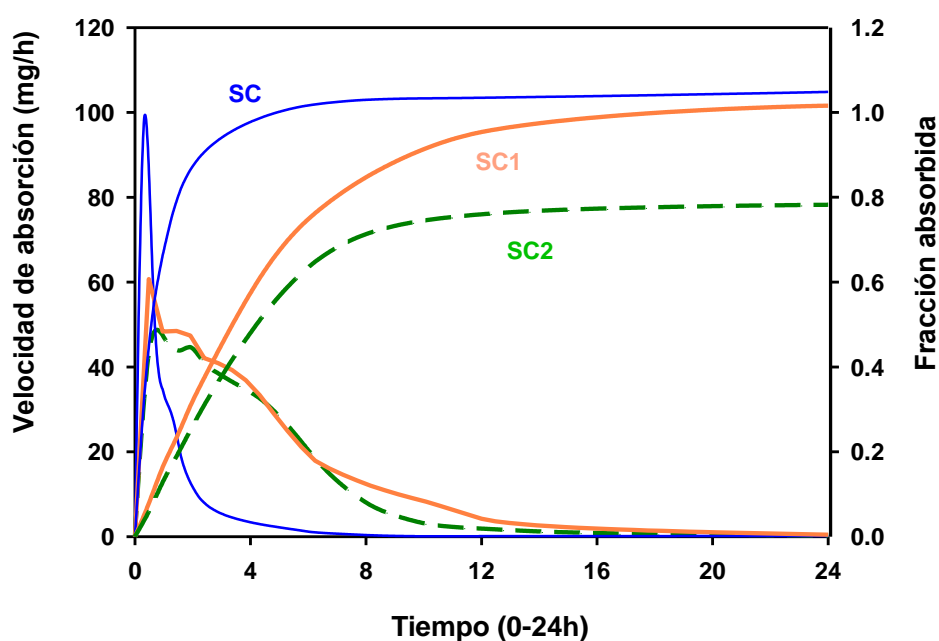


Figura 12.- Velocidades medias de absorción para las formulaciones SC, SC1 y SC2 (eje de la izquierda). Fracciones medias de absorción para las formulaciones SC, SC1 y SC2 (eje de la derecha).

Una inspección visual de las curvas mostradas en la figura 12 permite observar la existencia de picos solapados para las velocidades de absorción en las formulaciones SC1 y SC2 desde 1,00 hasta 8,00 horas, a diferencia de la formulación SC donde la caída es más rápida desde las 0,25 – 4,00 horas sin la existencia aparente de otros picos. La existencia de solapamiento puede reflejar diferentes velocidades de absorción para las formulaciones poliméricas.

La fracción absorbida, normalizada a dosis de 2 mg/kg, presenta diferencias aparentes para las formulaciones SC1 y SC2 respecto la SC convencional. En efecto, la curva de la formulación SC fue mayor que las curvas SC1 y SC2, respectivamente. Por otra parte, las formulaciones SC1 y SC2 fueron muy similares entre ellas hasta las 8,00 horas, donde la formulación SC1 es ligeramente mayor que la SC2 hasta las 12 horas.

La cantidad total de marbofloxacino que accede al compartimento central es de $133,92 \pm 47,69$ mg, $375,15 \pm 92,83$ mg y $276,35 \pm 53,63$ mg para las formulaciones SC, SC1 y SC2, respectivamente. Sin embargo, cuando se normalizan las dosis a 2 mg/kg, las fracciones absorbidas fueron de $1,13 \pm 0,25$, $1,03 \pm 0,22$ and $0,80 \pm 0,17$, para las formulaciones SC, SC1 y SC2, respectivamente.

Las curvas de las fracciones absorbidas muestran que el 90% de marbofloxacino se ha absorbido al cabo de un tiempo promedio de $2,93 \pm 1,07$ h, $11,23 \pm 0,95$ h y $9,02 \pm 0,72$ h para las formulaciones SC, SC1 y SC2, respectivamente. Estos resultados sugieren un retraso en la absorción para las formulaciones poliméricas respecto la formulación convencional.

Estas diferencias fueron evaluadas mediante pruebas estadísticas no paramétricas como en los casos anteriores mediante la H de Kruskall-Wallis, previa normalización de los parámetros a dosis de 2 mg/kg. Tras ellas, pudo comprobarse que existen diferencias significativas entre la velocidad máxima pero no en la cantidad ni en la fracción absorbida entre las tres formulaciones, tal y como se indica en la tabla 38, y en las figuras 13, 14 y 15, respectivamente.

Parámetros	Probabilidad (significación)
$V_{m\acute{a}x}$ (mg/h)	0,017
Cantidad absorbida (mg)	0,986
Fracción absorbida	0,784

P<0,05: diferencias significativas; P>0,05: diferencias no significativas.

TABLA 38.- Estudio comparativo no paramétrico (H Kruskall-Wallis) entre los parámetros obtenidos tras deconvolución numérica para marbofloxacino tras la administración de una dosis de 2 mg/kg por subcutánea (SC), y tras la administración de una dosis de 6 mg/kg por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a cabras.

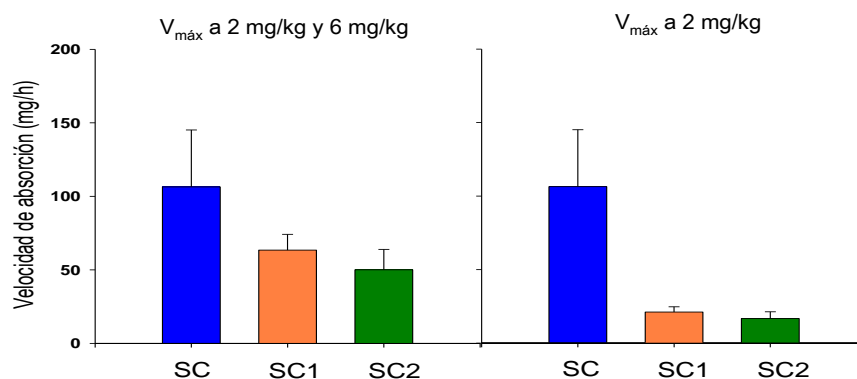


Figura 13.- Velocidades medias de absorción para las formulaciones SC, SC1 y SC2 a las dosis de 2, 6 y 6 mg/kg (eje de la izquierda) y normalizadas a 2 mg/kg (eje de la derecha).

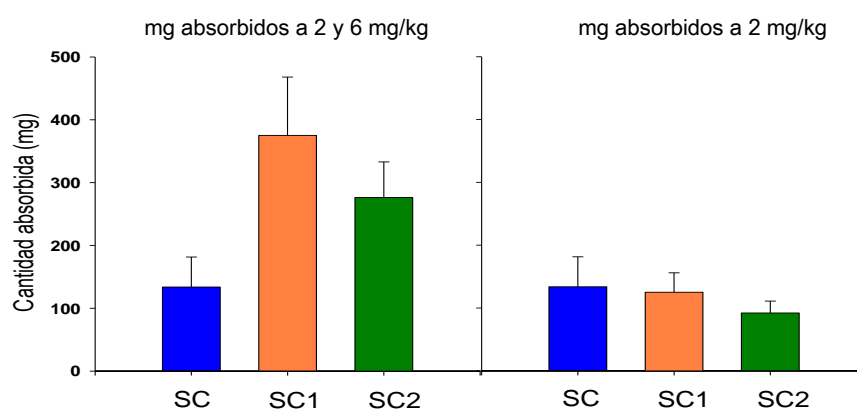


Figura 14.- Cantidades absorbidas para las formulaciones SC, SC1 y SC2 a las dosis de 2, 6 y 6 mg/kg (eje de la izquierda) y normalizadas a 2 mg/kg (eje de la derecha).

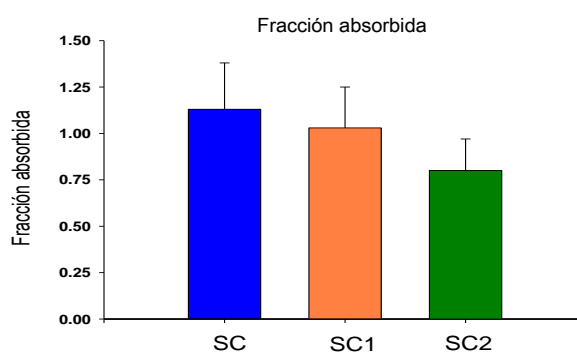


Figura 15.- Fracciones medias de absorción para las formulaciones SC, SC1 y SC2 a las dosis de 2, 6 y 6 mg/kg.

5.8.- ESTUDIO FARMACOCINÉTICO DE LA EXCRECIÓN EN LECHE DE MARBOFLOXACINO.

El tratamiento sistémico de la mamitis requiere un fármaco que penetre ampliamente desde la sangre a la leche. La difusión pasiva no-iónica en la ubre se ve afectada por las propiedades fisicoquímicas del fármaco (Atkinson y Begg, 1990, Ghering y cols 2006).

Marbofloxacin, como otras fluoroquinolonas, es una molécula anfótera con un pK_{a1} de 5,69 y un pK_{a2} de 8,02 (Martínez y cols., 2006). El pH de la leche de cabra tiene un rango entre 6,6 y 6,8, muy cercano al punto isoelectrónico teórico de marbofloxacin ($pI = 6,54$), que indica que el fármaco puede pasar de la sangre a la leche y quedar retenido por un mecanismo de captación iónica mostrando así una amplia penetración (Atkinson y Begg, 1990, Ghering y cols., 2006). Sin embargo, y más concretamente en el caso de las fluorquinolonas, la existencia de transportadores de la superfamilia ABC puede jugar un rol importante en la excreción en leche (Schricks y Fink-Gremmels., 2008)

5.8.1.- EVOLUCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE MARBOFLOXACINO EN LECHE: ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA.

La evolución de las concentraciones individuales y medias (\pm SD) experimentales de marbofloxacin obtenidas en leche de cabra (Tabla 21) tras la administración de una dosis de 2 mg/kg vía intravenosa se muestran en los Gráficos 22 y 23, en los que se pueden observar como se detectan concentraciones hasta las 48 h posteriores a la administración del fármaco (excepto en las cabras 2 y 3 que se detectaron hasta las 24 y 32 horas respectivamente). En la tabla 22 se incluyen los resultados del análisis de la varianza no paramétrico (test de Kruskal-Wallis) que indican que las concentraciones de marbofloxacin detectadas en leche, a sus correspondientes tiempos de ordeño, no varían entre animales, pero si entre tiempos.

Para nuestro conocimiento, no hay estudios sobre la penetración de marbofloxacin en leche de cabra, pero si los hay para otras fluoroquinolonas en cabra como enrofloxacin (Titos, 2010), moxifloxacin (Fernández-Varón y cols., 2006a), danofloxacin (Escudero y cols., 2007), difloxacin (Marín y cols., 2007c, Marín y cols., 2010a, Escudero y cols., 2011), orbifloxacin (Marín y cols., 2007a), ibafloxacin (Marín y cols., 2007b) y levofloxacin (Goudah y cols., 2008). En estos casos se ha detectado fármaco en leche hasta las 6 h en el caso de ibafloxacin, como valor más bajo, o hasta 48 h en el caso de difloxacin.

Los valores de concentraciones individuales y medias (media \pm SD) en leche se representan junto a las concentraciones individuales y medias plasmáticas (media \pm SD), en los Gráficos 24 y 25, respectivamente. Se puede observar como las concentraciones en leche del fármaco son ligeramente superiores a las plasmáticas en todos los animales, menos en la cabra 2, entre las 5–24 horas (considerando los tiempos de ordeño), puede observarse que los niveles promediados en leche son ligeramente superiores a los plasmáticos desde las 2 horas hasta las 48 horas. Esto indica que la velocidad de excreción del fármaco por la leche está, lógicamente, relacionada directamente con la curva de eliminación plasmática.

5.8.1.1.- TIEMPO MÁXIMO ($T_{m\acute{a}x}$) Y CONCENTRACIÓN MÁXIMA ($C_{m\acute{a}x}$).

El $T_{m\acute{a}x}$ obtenido ha sido de 2,17 h (Tabla 24), que resulta ser similar o inferior a los valores hallados para otras fluoroquinolonas administradas en cabras vía intravenosa. Así, para moxifloxacino, orbifloxacino, enrofloxacino, difloxacino, se obtuvieron valores superiores, concretamente de 2 h, 1,83 h, 1,6 h y 1,16 h respectivamente (Fernández-Varón y cols., 2006a; Marín y cols., 2007a, Titos, 2010 y Marín y cols., 2010a).

En cuanto a la $C_{m\acute{a}x}$ en leche, el valor obtenido para marbofloxacino en cabra tras la administración de una dosis de 2 mg/kg, ha sido de 1253,41 $\mu\text{g/L}$ (tabla 24), que es casi la mitad que el obtenido con enrofloxacino a una dosis de 5 mg/kg (2354,63 $\mu\text{g/L}$, Titos, 2010) y el obtenido con difloxacino, a una dosis de 5 mg/kg, (2120 $\mu\text{g/L}$, Marín y cols., 2007c). Para otras fluoroquinolonas como moxifloxacino y orbifloxacino, se han señalado valores de $C_{m\acute{a}x}$ de 3656,19 y 1560 $\mu\text{g/L}$, cuando se administró a una dosis de 5 y 2,5 mg/kg, respectivamente (Fernández-Varón y cols., 2006a; Marín y cols., 2007a).

5.8.1.2.- ÁREA BAJO LA CURVA (AUC) y RATIO AUC_{leche}/AUC_{plasma} .

Otro parámetro de interés es el área bajo la curva de concentración en leche-tiempo (AUC_{leche}), obtenido tras la administración intravenosa del fármaco a una dosis de 2 mg/kg, que alcanza un valor de 6239,43 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ inferior a los valores encontrados para 5 mg/kg de enrofloxacino y difloxacino (9292,28 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ y 10420 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$, Titos 2010, Marín y cols., 2007c), pero similar en orbifloxacino, al administrar una dosis de 2,5 mg/kg, el resultado para el AUC fue de 6360 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ (Marín y cols., 2007a).

Este parámetro puede utilizarse para estimar la penetración del fármaco en leche mediante la relación AUC_{leche}/AUC_{plasma} , cuyo valor es de $0,86 \pm 0,47$ (tabla 24), que indicaría que la penetración en leche tras la administración intravenosa es cercana a uno. Esto induce a pensar que no existe acumulación significativa del antimicrobiano en leche.

En el caso de ibafloxacino en cabras, se ha descrito un valor de $AUC_{leche}/AUC_{plasma} = 0,2$ inferior al descrito en nuestro estudio, siendo su penetración mucho menor (Marín y cols., 2007b). No ocurre lo mismo con pefloxacino (Abd El-Aty y Goudah, 2002), moxifloxacino (Fernández-Varón y cols., 2006a) y orbifloxacino (Marín y cols., 2007a), cuyas ratios AUC_{leche}/AUC_{plasma} fueron de 3,33, 1,86 y 1,02, respectivamente; valores que hacen pensar en una penetración en leche mejor para estas fluoroquinolonas.

5.8.1.3.- TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA (MRT).

En la leche, el MRT alcanza un valor promediado de 5,05 h, que comparado con el obtenido en plasma de 2,95 h, indica que las concentraciones alcanzadas en leche pueden ser más persistentes que las plasmáticas.

Comparado con los datos obtenidos en cabras para enrofloxacino a dosis de 5 mg/kg vía intravenosa (Titos, 2010), se obtiene un valor de 4,30 horas que resulta ser ligeramente inferior al hallado (0,83 veces) en nuestro caso.

5.8.1.4.- CANTIDAD TOTAL DE MARBOFLOXACINO ELIMINADA EN LECHE.

La cantidad total eliminada en leche tras la administración intravenosa de una dosis de 2 mg/kg de marbofloxacino, ha supuesto un 1,03 %, como valor medio, de la cantidad administrada (Tabla 24). Valores inferiores a los descritos en nuestro estudio, han sido aportados para otras fluoroquinolonas administradas en cabras por vía intravenosa. Para moxifloxacino y difloxacino, tras administrar una dosis de 5 mg/kg, la cantidad total de fármaco eliminada en leche fue de 0,21% y 0,46%, respectivamente (Fernández-Varón y cols., 2006a; Marín y cols., 2007c). En el caso de ibafloxacino y orbifloxacino, se han eliminado unas cantidades en leche de 0,36% y 0,28%, tras administrar una dosis de 15 y 2,5 mg/kg, respectivamente (Marín y cols., 2007b; Marín y cols., 2007a).

5.8.2.- EVOLUCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE MARBOFLOXACINO EN LECHE: ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA.

La evolución de las concentraciones individuales y medias (\pm SD) experimentales de marbofloxacino obtenidas en leche de cabra tras la administración de una dosis de 2 mg/kg vía subcutánea aparecen en la tabla 25 y se representan en los Gráficos 26 y 27, en los que se pueden observar como se detectan concentraciones hasta las 48 h posteriores a la administración del fármaco (excepto en las cabras 2 y 4 que se detectaron hasta las 32 horas. En la tabla 26 se incluyen los resultados del test de Kruskal-Wallis que indican que las concentraciones de marbofloxacino detectadas en leche, a sus correspondientes tiempos de ordeño, no varía entre animales, pero si entre tiempos.

Los valores de concentraciones individuales y medias (media \pm SD) en leche se representan junto a las concentraciones individuales y medias plasmáticas (media \pm SD) en los Gráficos 28 y 29, respectivamente. Podemos observar que, las concentraciones en leche, una vez alcanzas las 5 h, superan ligeramente a las concentraciones en plasma hasta las 8h, a partir de aquí la eliminación (disposición) parece estar equilibrada, y la fase descendente de ambas curvas es muy similar, hasta las 48 h, y igual que ocurría en la vía intravenosa.

5.8.2.1.- TIEMPO MÁXIMO ($T_{m\acute{a}x}$) Y CONCENTRACIÓN MÁXIMA ($C_{m\acute{a}x}$).

El $T_{m\acute{a}x}$ que se ha obtenido (Tabla 28) ha sido de 2,33 h para marbofloxacino, muy similar al obtenido por vía intravenosa. Para otras fluoroquinolonas administradas en cabras vía subcutánea, se han descrito valores de $T_{m\acute{a}x}$ en leche similares, superiores e inferiores a las descritas en nuestro estudio. Así, cuando se administró orbifloxacino vía subcutánea se obtuvo un valor de 2 h (Marín y cols., 2007a), valor similar pero inferior al obtenido para moxifloxacino de 3,33 h (Fernández-Varón y cols., 2006a), para enrofloxacino de 3,2 h (Titos, 2010) y difloxacino para la cual, tras su administración subcutánea, el $T_{m\acute{a}x}$ en leche fue de 4 h (Marín y cols., 2007c).

En cuanto a la $C_{m\acute{a}x}$ en leche, el valor obtenido fue de 1692,71 $\mu\text{g/L}$, ligeramente superior al intravenoso (1253,41 $\mu\text{g/L}$, tabla 24), pero similar al obtenido para orbifloxacino en leche de 1730 $\mu\text{g/L}$ (Marín y cols., 2007a), y comparable también con el obtenido para enrofloxacino de 1679,98 $\mu\text{g/L}$ (Titos, 2010). Este último resultado de $C_{m\acute{a}x}$ es inferior al obtenido

por vía intravenosa de 2354,63 $\mu\text{g/L}$ (Titos, 2010). Igual ocurre con otras quinolonas administradas en cabras por las dos vías, concretamente con moxifloxacino y difloxacino. Para el primero su $C_{\text{máx}}$ hallada en leche fue de 3656,19 $\mu\text{g/L}$, mientras que cuando se administró vía subcutánea fue de 3216,68 $\mu\text{g/L}$ (Fernández-Varón y cols., 2006a). Para el segundo se obtuvo un valor de $C_{\text{máx}}$ en leche de 2120 $\mu\text{g/L}$, en cambio cuando se administró vía subcutánea el valor aportado fue de 1200 $\mu\text{g/L}$ (Marín y cols., 2007c). Los valores obtenidos para la vía subcutánea en ambas quinolonas, moxifloxacino y difloxacino, son superiores e inferiores, respectivamente, con respecto al valor obtenido en nuestro estudio para marbofloxacin.

5.8.2.2.- ÁREA BAJO LA CURVA (AUC) y RATIO $\text{AUC}_{\text{leche}}/\text{AUC}_{\text{plasma}}$.

El área bajo la curva de concentración en leche-tiempo (AUC), obtenido tras la administración subcutánea de marbofloxacin a 2 mg/kg de dosis fue de 8308,53 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ (tabla 28), 1,3 veces superior al intravenoso de 6239,43 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ (tabla 24). Si se compara con otras fluoroquinolonas, ocurre lo mismo, para enrofloxacin a una dosis de 5 mg/kg, alcanza un valor de 9999,04 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ y para la vía intravenosa de 9292,28 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ (Titos, 2010). De la misma manera, para orbifloxacin en ambas vías el $\text{AUC}_{\text{leche iv}} = 6360 \mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ y el $\text{AUC}_{\text{leche sc}} = 7580 \mu\text{g}\cdot\text{h/L}$; (Marín y cols., 2007a). Pero también ocurre lo contrario, para difloxacino vía subcutánea, se describió un valor de AUC en leche de 114600 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ frente a los 15100 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ intravenosos (Marín y cols., 2010a).

El AUC también nos permite, al igual que en la vía intravenosa, estimar la penetración de marbofloxacin en leche tras la administración de una dosis de 2 mg/kg vía subcutánea. Para ello se calcula el ratio que relaciona las AUC en leche/plasma del fármaco, obtenidas tras su administración subcutánea. El valor de dicha ratio $\text{AUC}_{\text{leche}}/\text{AUC}_{\text{plasma}}$ ha sido de $0,97 \pm 0,33$ ligeramente superior a los 0,86 alcanzados por vía intravenosa. Para otras fluoroquinolonas en cabras, se han descrito valores de la ratio $\text{AUC}_{\text{leche}}/\text{AUC}_{\text{plasma}}$ superiores, similares e inferiores a los hallados en nuestro estudio. Así, moxifloxacino, orbifloxacin y difloxacino, obtienen un valor de de $\text{AUC}_{\text{leche}}/\text{AUC}_{\text{plasma}}$ de 2,33, 1,15 y 0,68, respectivamente (Fernández-Varón y cols., 2006a; Marín y cols., 2007a; Marín cols., 2007c). Como se puede comprobar tanto moxifloxacino como orbifloxacin tienen una buena penetración en leche tras su administración subcutánea, al igual que ocurría cuando se administraban vía intravenosa.

5.8.2.3.- RATIO $C_{\text{máx-leche}}/C_{\text{máx-plasma}}$.

Otro parámetro que nos permite estimar la penetración del fármaco en leche, al igual que la ratio $AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{plasma}}$, es la ratio $C_{\text{máx-leche}}/C_{\text{máx-plasma}}$ tras la administración de una dosis de 2 mg/kg vía subcutánea. Para ello se calcula la ratio que relaciona la $C_{\text{máx}}$ en leche obtenida tras la inyección subcutánea con la $C_{\text{máx}}$ plasmática del fármaco. El valor de la ratio $C_{\text{máx-leche}}/C_{\text{máx-plasma}}$ ha sido de 0,81, que es ligeramente inferior a uno (pero cercano) lo que nos indicaría lo mismo que la ratio $AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{plasma}}$. Ratios superiores a las descritas por nosotros han sido publicadas para moxifloxacino, orbifloxacino y difloxacino, tras ser administradas vía subcutánea en cabras. Estas ratios fueron de 1,87, 0,95 y 0,90, respectivamente (Fernández-Varón y cols., 2006a; Marín y cols., 2007a; Marín y cols., 2007c).

5.8.2.4.- TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA (MRT).

Este parámetro alcanza un valor de 5,16 h (Tabla 28), similar al obtenido para el plasma (4,15 h, tabla 8). También es muy parecido al obtenido en leche tras la administración intravenosa (5,06) por lo que este parámetro no parece ser muy dependiente de la vía de administración.

5.8.2.5.- CANTIDAD TOTAL ELIMINADA EN LECHE.

La cantidad total eliminada en leche tras la administración subcutánea de una dosis de 2 mg/kg de marbofloxacino, ha supuesto un 0,64% de la dosis administrada, inferior al 1% que se obtuvo en el caso de la administración intravenosa.

Valores inferiores a los descritos en nuestro estudio, han sido reportados para otras fluoroquinolonas administradas en cabras. La cantidad total de enrofloxacino eliminada en leche tras la administración subcutánea de una dosis de 5 mg/kg de enrofloxacino, han supuesto un 0,24% frente al 0,27% hallado para la vía intravenosa (Titos, 2010). Valores similares se han señalado para moxifloxacino y difloxacino, para los que la cantidad total de fármaco eliminada en leche fue de 0,29% y 0,35%, respectivamente (Fernández-Varón y cols., 2006a; Marín y cols., 2007c). En el caso de orbifloxacino, se ha eliminado una cantidad en leche de 0,32% (Marín y cols., 2007a).

5.8.3.- EVOLUCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE MARBOFLOXACINO EN LECHE: ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA EN SOLUCIÓN DEL POLÍMERO P407 AL 25%.

Las concentraciones individuales y medias (media \pm SD) experimentales de marbofloxacino obtenidas en leche de cabra tras la administración de una dosis de 6 mg/kg en formulación SC1 vía subcutánea se muestran en la tabla 29 y su representación en los Gráficos 30 y 31. Se puede observar que se detectan concentraciones de hasta las 48 h posteriores a la administración en todos los animales. En la tabla 30 se incluyen los resultados del test de Kruskal-Wallis que indican que las concentraciones de marbofloxacino detectadas en leche, a sus correspondientes tiempos de ordeño, no varía entre animales, pero sí entre tiempos.

Los valores de concentraciones individuales y medias (media \pm SD) en leche se representan junto a las concentraciones individuales y medias plasmáticas (media \pm SD) en los Gráficos 32 y 33. Podemos observar como las concentraciones en leche son ligeramente superiores entre las 5 – 48 h posteriores a la administración del fármaco, y al igual que ocurría tras la administración vía intravenosa y subcutánea sin polímero P407, puede resultar interesante para el tratamiento de la mamitis. Para nuestro conocimiento, sólo existen en la literatura estudios farmacocinéticos de las concentraciones de enrofloxacino y difloxacino en leche de cabras, tras su administración en fórmulas de liberación controlada como es el polímero P407, por lo que los parámetros farmacocinéticos obtenidos se referían a esas publicaciones (Titos, 2010, Marín y cols., 2010a).

5.8.3.1.- TIEMPO MÁXIMO ($T_{m\acute{a}x}$) Y CONCENTRACIÓN MÁXIMA ($C_{m\acute{a}x}$).

El valor que se ha obtenido para el tiempo en que se alcanza la concentración máxima en leche o tiempo máximo ($T_{m\acute{a}x}$) ha sido de 4,0 h, superior (Tabla 32), casi el doble, que los hallados en la formulación convencional. En el caso de enrofloxacino se encuentra que, con la formulación SC1, se alcanzan valores de 5,6 h frente a 3,2 h y 1,3 h respectivamente, tras su administración subcutánea sin polímero e intravenosa (en este último caso es casi 4 veces superior, Titos, 2010), y para difloxacino (Marín y cols., 2010a) con 3,6 h frente a 4 h y 1,16 h tras su administración subcutánea sin polímero e intravenosa (en este último caso es similar a su administración subcutánea sin polímero y casi tres veces superior a la intravenosa). En todos los casos, y marbofloxacino no es una excepción, el valor de $T_{m\acute{a}x}$ obtenido en leche con la

formulación SC1 resulta superior, o igual, en las vías subcutáneas sin polímero, pero siempre es superior al obtenido por vía intravenosa.

En cuanto a la $C_{m\acute{a}x}$ en leche, el valor obtenido en solución del polímero P407 al 25% en cabras ha sido de 3074,37 $\mu\text{g/L}$, que es prácticamente el doble que el alcanzado por vía subcutánea sin polímero e intravenosa (1693 $\mu\text{g/L}$ y 1254 $\mu\text{g/L}$ respetivamente). Sin embargo, la dosis utilizada ha sido tres veces superior (6 mg/kg frente a 2 mg/kg), y corrigiendo esas diferencias a 2 mg/kg resulta ser 0,6 y 0,7 veces inferior. Comparado con enrofloxacin y difloxacin (Titos, 2010, Marín y cols., 2010a) se obtienen relaciones similares, valores de $C_{m\acute{a}x}$ de 2275,26 $\mu\text{g/L}$ frente a 2354,63 $\mu\text{g/L}$ y 1679,98 $\mu\text{g/L}$ y de $C_{m\acute{a}x}$ de 2970 $\mu\text{g/L}$ frente a 3090 $\mu\text{g/L}$ y 1340 $\mu\text{g/L}$ para las vías intravenosa y subcutánea sin polímero. En estos casos también se utiliza una dosis tres veces superior, que una vez corregida aporta unos valores de $C_{m\acute{a}x}$ de 759 $\mu\text{g/L}$ y de 990 $\mu\text{g/L}$ para cada uno, que son 0,3 – 0,45 y 0,3 - 0,7 veces inferiores a los alcanzados por vía intravenosa y subcutánea sin polímero, al igual que le ocurre a marbofloxacin.

5.8.3.2.- ÁREA BAJO LA CURVA (AUC) y RATIO $AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{plasma}}$.

El área bajo la curva de concentración en leche-tiempo (AUC), obtenida tras la administración subcutánea de marbofloxacin en formulación SC1 a una dosis de 6 mg/kg, alcanza un valor de 24256,48 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ (tabla 32). Este valor es muy superior al hallado cuando administramos el fármaco vía intravenosa y subcutánea sin polímero, concretamente es casi 3,6 veces superior al descrito para la vía intravenosa y 2,9 veces superior al obtenido cuando se administró vía subcutánea. Hay que tener en cuenta que la dosis administrada en las vías intravenosa y subcutánea sin polímero fue de 2 mg/kg, tres veces inferior, de manera que, corrigiendo estas diferencias, se obtiene un valor de AUC en leche teórico a 2 mg/kg de 8086 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ que es más similar a los obtenidos para la vía intravenosa y subcutánea. Estas mismas diferencias en el valor de AUC_{SC1} obtenido respecto a los AUC_{IV} y AUC_{SC} pueden encontrarse para enrofloxacin y difloxacin en cabras (Titos, 2010, Marín y cols., 2010a).

A partir de este parámetro, estimaremos la penetración de marbofloxacin en leche, tras la administración de una dosis de 6 mg/kg en formulación SC1 vía subcutánea. Para ello se calcula la ratio que relaciona las áreas bajo la curva de concentración en leche-tiempo de marbofloxacin, obtenidas tras la administración subcutánea en formulación SC1, con las áreas

totales bajo la curva de concentración plasmática y el valor medio obtenido de la ratio $AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{plasma}}$ ha sido de 1,12, similar, aunque ligeramente superiores a los de la formulación convencional. Este valor es superior al encontrado para enrofloxacin de 0,67 (Titos, 2010), pero similar al de difloxacin administrado en cabras por vía subcutánea con polímero P407, el cual fue de 0,92 (Marín y cols., 2010a). Estos resultados indican que, posiblemente, la penetración de marbofloxacin y difloxacin sea similar, y aproximadamente el doble que la de enrofloxacin.

5.8.3.3.- RATIO $C_{\text{máx-leche}}/C_{\text{máx-plasma}}$.

Con este parámetro podemos estimar también la penetración del fármaco en leche, el valor de la ratio $C_{\text{máx-leche}}/C_{\text{máx-plasma}}$ ha sido de 1,21 (tabla 32) frente a 0,35 y 0,81 obtenidos en las vías intravenosa y subcutáneas sin polímero. Comparado con enrofloxacin y difloxacin, con valores de 0,68 y 0,96, (Titos, 2010 y Marín y cols., 2010a) cuando se administraron cada uno en cabras por vía subcutánea con polímero P407, podemos decir que, posiblemente, la penetración de marbofloxacin y difloxacin sea similar, y aproximadamente el doble que la de enrofloxacin, como hemos señalado para la ratio anteriormente comentada.

5.8.3.4.- TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA (MRT).

Tras la administración de una dosis de 6 mg/kg en formulación SC1, el MRT alcanza un valor de 7,54 h (Tabla 32), superior al descrito para la vía intravenosa. Esta diferencia es algo menor que la que se observa de los valores de de MRT, 11,42 h frente a 4,3 h y 5,23 h para las vías intravenosa y subcutánea para enrofloxacin en leche (Titos, 2010).

Al comparar los valores de MRT obtenidos en leche para marbofloxacin con los hallados en plasma, se observa en leche una relación $MRT_{\text{leche}}/MRT_{\text{plasma}}$ 1,2 veces superior con el polímero P407, frente a las 1,26 y 1,46 veces superior para las vías subcutáneas sin polímero e intravenosa. Como se puede observar, los valores de MRT son más elevados en leche que en plasma, pero hay mayor diferencia entre las administraciones con y sin polímero que las que utilizan P407.

5.8.3.5.- CANTIDAD TOTAL DE MARBOFLOXACINO ELIMINADA EN LECHE.

La cantidad total de marbofloxacino eliminada en leche tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg en formulación SC1, ha supuesto un 0,77% de la cantidad administrada (Tabla 32). Este valor es muy similar al obtenido para la vía subcutánea sin polímero de 0,64% y ligeramente inferior al descrito para la vía intravenosa, que fue de 1,02%.

5.8.4.- EVOLUCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE MARBOFLOXACINO EN LECHE: ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA EN SOLUCIÓN DEL POLÍMERO P407 AL 25% + CARBOXIMETILCELULOSA AL 2%.

La evolución de las concentraciones individuales y medias (media \pm SD) experimentales de marbofloxacino obtenidas en leche de cabra tras la administración de una dosis de 6 mg/kg en formulación SC2 vía subcutánea se muestran en la tabla 33 y se representan en los Gráficos 34 y 35, donde puede observarse como se detectan, para todos los animales, concentraciones en leche hasta las 48 h posteriores a la administración del fármaco.

Si comparamos estos resultados con los obtenidos tras administrar marbofloxacino en formulación SC1, se puede observar como las concentraciones se detectan igualmente hasta las 48 h (Gráficos 30 y 31). Anteriormente tras la administración del antimicrobiano vía intravenosa y vía subcutánea sin el polímero a una dosis de 2 mg/kg, se detectaban concentraciones en leche, hasta las 48 h posteriores a la administración (Gráficos 22 y 23, 26 y 27).

Podemos observar que, como en los casos anteriores, existe un cierto paralelismo (Gráfico 36) entre las concentraciones en leche y en plasma y, si observamos los valores medios, podemos globalizar que las concentraciones en leche son superiores a las plasmáticas y se mantienen durante un periodo de tiempo de 5 – 24 horas. Y al igual que ocurría tras la administración vía intravenosa y subcutánea sin y con polímero P407, puede resultar interesante para el tratamiento de la mastitis.

Para nuestro conocimiento, sólo existen en la literatura estudios farmacocinéticos de las concentraciones de enrofloxacino y difloxacino en leche de cabras, tras su administración en fórmulas de liberación retardada como es el polímero P407 + 2% de carboximetilcelulosa, por lo que los parámetros farmacocinéticos obtenidos se referían a esas publicaciones (Titos, 2010, Escudero y cols., 2011).

5.8.4.1.- TIEMPO MÁXIMO ($T_{m\acute{a}x}$) Y CONCENTRACIÓN MÁXIMA ($C_{m\acute{a}x}$).

El valor de $T_{m\acute{a}x}$ que se ha obtenido (tabla 36) ha sido de 4,33 h casi el doble que los hallados en las vías anteriores sin polímero (2,17 h y 2,33 h tras su administración subcutánea sin polímero e intravenosa) pero sólo ligeramente superior al del polímero P407 ($T_{m\acute{a}x} = 4$ h).

Comparado con otras fluoroquinolonas en cabras, para enrofloxacino se encuentra que, con la formulación SC2, se alcanzan valores de 6 h frente a 5,6 h, 3,2 h y 1,3 h respectivamente, tras su administración subcutánea con y sin polímero e intravenosa (en este último caso es casi 5 veces superior, Titos, 2010), pero similar para difloxacino (Escudero y cols., 2011, Marín y cols., 2010a) con 4h, frente a 3,6 h, 4 h y 1,16 h tras su administración subcutánea con y sin polímero e intravenosa. En todos los casos, y marbofloxacino no es una excepción, el valor de $T_{m\acute{a}x}$ obtenido en leche con la formulación SC2 resulta superior, o igual, en las vías subcutáneas con y sin polímero, pero siempre es superior al obtenido por vía intravenosa.

En cuanto a la $C_{m\acute{a}x}$ en leche, el valor obtenido en solución del polímero P407 al 25% + 2% Carboximetilcelulosa en cabras ha sido de 2281,72 $\mu\text{g/L}$ (Tabla 36), que es muy similar al obtenido en formulación del polímero P407, y prácticamente el doble que el alcanzado por vía subcutánea sin polímero e intravenosa. Como la dosis utilizada ha sido tres veces superior (6 mg/kg frente a 2 mg/kg), y corrigiendo esas diferencias a 2 mg/kg resulta ser inferior con relaciones de 0,8, 0,46 y 0,6 veces. Comparado con enrofloxacino y difloxacino (Titos, 2010, Escudero y cols., 2011) se obtienen valores similares $C_{m\acute{a}x}$ de 2162,28 $\mu\text{g/L}$ y de 2910 $\mu\text{g/L}$ respectivamente. En estos casos también se utiliza una dosis tres veces superior, que una vez corregida aporta unos valores de $C_{m\acute{a}x}$ de 720 $\mu\text{g/L}$ y de 970 $\mu\text{g/L}$ para cada uno, que son inferiores a los alcanzados por vía intravenosa y subcutánea con y sin polímero, al igual que le ocurre a marbofloxacino.

5.8.4.2.- ÁREA BAJO LA CURVA (AUC) y RATIO $AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{plasma}}$.

El AUC en leche-tiempo, obtenido tras la administración subcutánea en formulación SC2 a una dosis de 6 mg/kg, alcanza un valor de 21549,58 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$, muy similar al obtenido en formulación SC1 y casi el doble que el obtenido por las vías intravenosa y subcutánea sin polímero. Sin embargo, y al igual que le ocurría a la formulación anterior SC1, resultados similares se obtienen al corregir estos valores a la dosis de 2mg/kg.

A partir de este parámetro, al igual que en anteriores vías, calcularemos la ratio que relaciona las áreas bajo la curva de concentración en leche-tiempo, obtenidas tras la administración subcutánea en formulación SC2, con las áreas totales bajo la curva de concentración plasmática. Se calcula un valor de 1,25, que resulta ser del mismo orden de magnitud que el obtenido para la formulación SC1.

5.8.4.3.- RATIO $C_{\text{máx-leche}}/C_{\text{máx-plasma}}$.

El valor de la ratio $C_{\text{máx-leche}}/C_{\text{máx-plasma}}$ ha sido de 1,13, ligeramente superior a los obtenidos para las formulaciones anteriores de 0,35 y 0,8 para las vías intravenosa y subcutánea sin polímero, pero similar al de la formulación SC1 de 1,21 respectivamente.

Comparado con enrofloxacino y difloxacino, con valores de 0,89 y 0,86, (Titos, 2010 y Marín y cols., 2010a) cuando se administraron cada uno en cabras a una dosis de 15 mg/kg vía subcutánea con polímero P407 + 2% carboximetilcelulosa, podemos decir que, posiblemente, la penetración de marbofloxacino y difloxacino sea similar, y aproximadamente el doble que con enrofloxacino.

5.8.4.4.- TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA (MRT).

Tras la administración de una dosis de 6 mg/kg en formulación SC2, el MRT alcanza un valor de 7,69 h (Tabla 36). Este valor de MRT obtenido en leche tras su administración en formulación SC2 es superior en casi 3 h a los descritos para las vías intravenosa y subcutánea sin polímero, pero es similar al obtenido en leche cuando se administra en formulación SC1.

5.8.4.5.- CANTIDAD TOTAL DE MARBOFLOXACINO ELIMINADA EN LECHE.

La cantidad total de marbofloxacino eliminada en leche tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg en formulación SC2, han supuesto un 0,56% de la dosis administrada (Tabla 36).

Estos valores son inferiores a los descritos para la vía subcutánea, al administrar el marbofloxacino en formulación SC1, que fue del 0,77 % de la dosis administrada de 6 mg/kg. Además, al igual que ocurría en esta vía comentada, estos valores son inferiores a los hallados

para la vía subcutánea sin polímero e intravenosa, los cuales fueron del 1,03 % y un 1,02 %, respectivamente, de la dosis administrada de 2 mg/kg.

Por tanto, como se comentó anteriormente, la cantidad eliminada por leche marbofloxacino es superior cuando se administra por vía intravenosa y subcutánea sin polímero y que parece estar relacionado con la biodisponibilidad.

5.9.- COMPARACIÓN ENTRE ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA, SUBCUTÁNEA Y SUBCUTÁNEA DE MARBOFLOXACINO EN: SOLUCIÓN DEL POLÍMERO P407 AL 25% Y EN SOLUCIÓN DEL POLÍMERO P407 AL 25% + CARBOXIMETILCELULOSA AL 2%.

La evolución de las concentraciones en leche de marbofloxacino tras las diversas vías de administración de este estudio, en la cabra, puede observarse gráficamente en los Gráficos 38 y 39, para todas las vías y para las extravasculares, respectivamente. Los parámetros farmacocinéticos no compartimentales la tabla 37. En la tabla 38 se muestran los resultados del estudio comparativo no paramétrico (prueba H Kruskal-Wallis) entre ellos y en la tabla 39 el de la T de Wilcoxon.

5.9.1.- ÁREA BAJO LA CURVA (AUC).

La prueba H de Kruskal-Wallis pone de manifiesto que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores de AUC obtenidos en los 4 casos (tabla 38), pero cuando comparamos uno a uno (tabla 39) vemos que no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) en las comparaciones de la formulación convencional por las dos vías de administración ni cuando se comparan las dos formulaciones de liberación controlada. Estas diferencias son pues significativas cuando se comparan la formulación convencional, por cualquier vía, con cualquiera de las dos formulaciones de liberación controlada. Es preciso señalar que, en el caso de las formulaciones retardadas, si se corrige el AUC a una dosis 3 veces menor (2 mg/kg), obtendríamos unos valores de AUC de las formulaciones de liberación sostenida son muy similares entre sí y con las convencionales, algo parecido a lo que ocurría cuando se corregían las AUC plasmática. Esto se puede observar de forma gráfica en la figura 16.

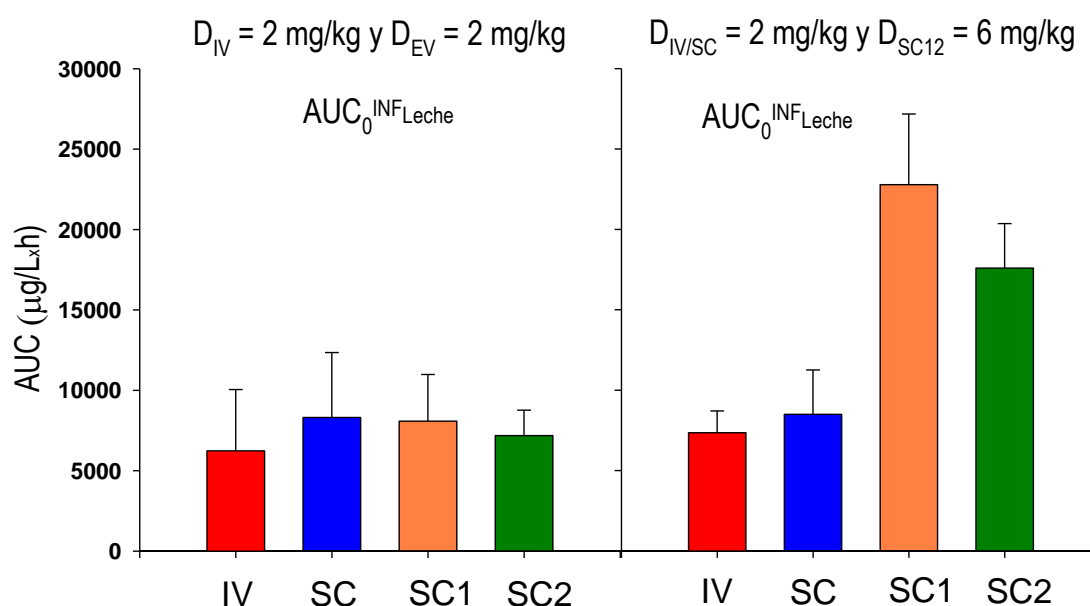


Figura 16.- Área bajo la curva de concentración en leche-tiempo (AUC) obtenidos para marbofloxacin en la cabra tras la administración por vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC) a una dosis de 2 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 6 mg/kg. A la izquierda valores de $AUC_{0-\infty}$ corregidos a una dosis de 2 mg/kg para SC1 y SC2.

5.9.2.- TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA (MRT).

Al comparar el valor de MRT intravenoso con los obtenidos en las vías subcutáneas (formulación convencional, en formulación SC1 y SC2), se puede observar que existen diferencias significativas entre todos ellos ($p < 0,05$; tabla 38). Como se puede apreciar (Tabla 37), la presencia de marbofloxacin en leche es más prolongada cuando se administra el fármaco vía subcutánea en formulación SC1 y SC2. Pudiendo ser por tanto, estas vías la de elección a fin de obtener concentraciones del fármaco en leche durante un mayor periodo de tiempo. No obstante, hay que indicar que, la diferencia de tiempo, pese a ser estadísticamente diferente, no es muy distinta en realidad, ya que entre un valor medio de 5,05 h para la vía IV y de 7,69 h para la SC2 no hay tanta diferencia desde un punto de vista práctico, por lo que la elección de una vía de administración bajo este criterio puede ser cuestionable.

A continuación (Figura 17), se presentan los valores de MRT de forma gráfica, para marbofloxacin en los casos estudiados:

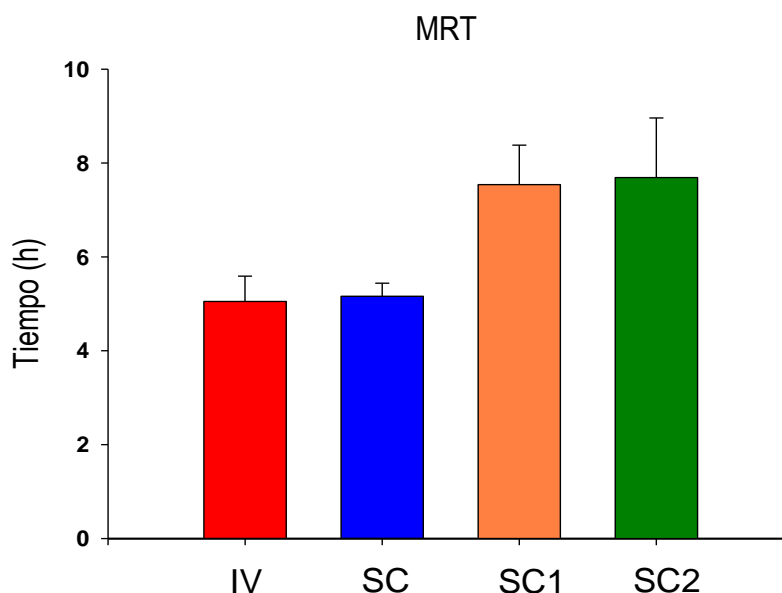


Figura 17.- Tiempo medio de residencia (MRT) d marbofloxacino en leche obtenido en la cabra tras la administración vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC) a una dosis de 2 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 6 mg/kg.

5.9.3.- TIEMPO MÁXIMO ($T_{m\acute{a}x}$) Y CONCENTRACIÓN MÁXIMA ($C_{m\acute{a}x}$).

La Tabla 38 pone de manifiesto que existen diferencias significativas entre los valores de los dos parámetros ($p < 0,05$) para las administraciones de la formulación convencional y las dos formulaciones retardadas. Por tanto, ambas alcanzan su $C_{m\acute{a}x}$ en leche a tiempos diferentes. Sin embargo, estas diferencias sólo se reducen a las comparaciones entre el $C_{m\acute{a}x}$ tras la administración IV y la SC1 (tabla 39).

En la siguientes figuras (18 y 19), se observa de forma gráfica las diferencias existentes para el marbofloxacino (A) y para sus valores de $C_{m\acute{a}x}$ corregidos a igualdad de dosis respecto la vía intravenosa y subcutánea con y sin polímero, y con respecto al $T_{m\acute{a}x}$ en leche:

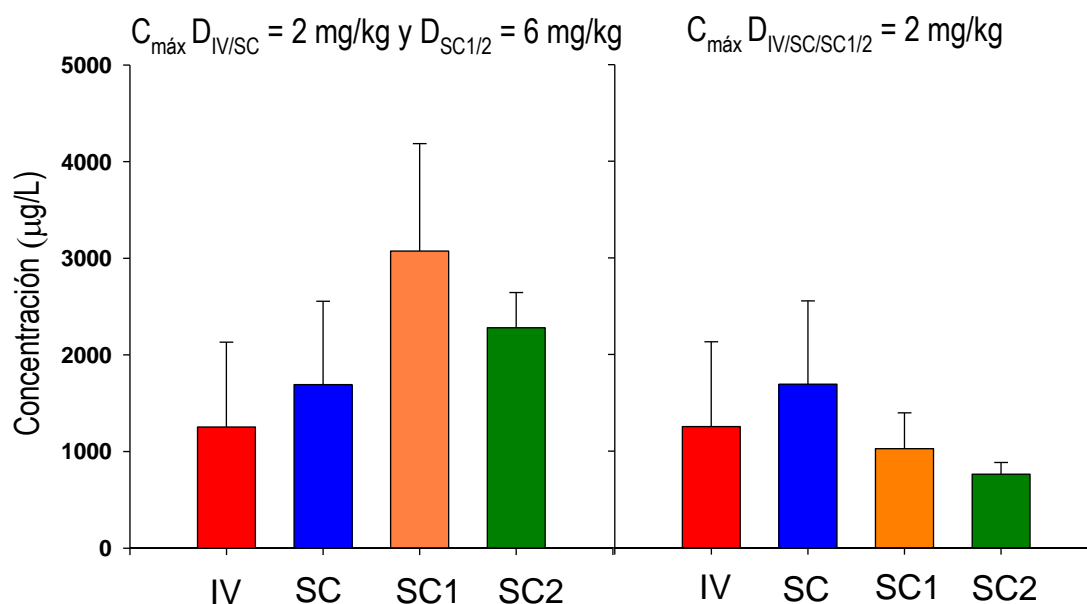


Figura 18.- Concentración máxima de marbofloxacino en leche obtenida en la cabra tras la administración vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC) a una dosis de 2 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 6 mg/kg. *Valores de $C_{\text{máx}}$ de marbofloxacino en el gráfico de la derecha obtenidos para la leche, tras administración SC1 y SC2 corregidas a una dosis de 2 mg/kg.

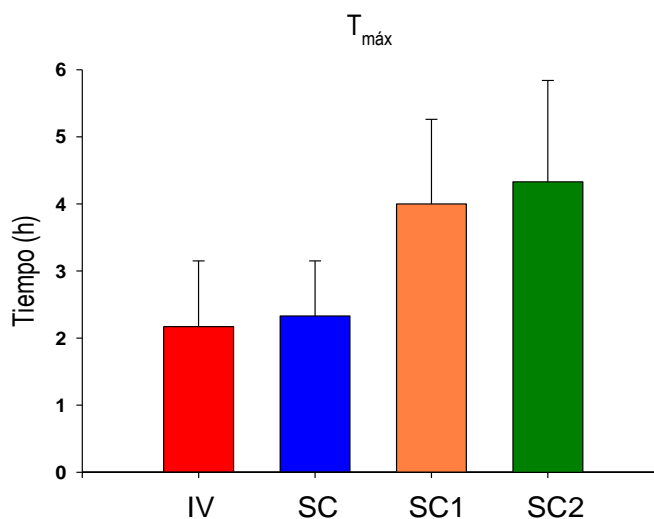


Figura 19.- Tiempo en que se alcanza la concentración máxima de marbofloxacino en leche obtenido en la cabra tras la administración vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC) a una dosis de 2 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 6 mg/kg.

5.9.4.- RATIO $C_{\max\text{Leche}}/C_{\max\text{Plasma}}$

Al comparar el valor de los ratios $C_{\max\text{Leche}}/C_{\max\text{Plasma}}$ intravenoso con los obtenidos en las vías subcutáneas (formulación convencional, en formulación SC1 y SC2), se puede observar que existen diferencias significativas entre todos ellos ($p < 0,05$). Sin embargo, no existen diferencias significativas cuando se comparan las formulaciones extrvasculares entre sí. A continuación (Figura 20), se presentan los valores de estos ratios de forma gráfica, para marbofloxacino en los casos estudiados:

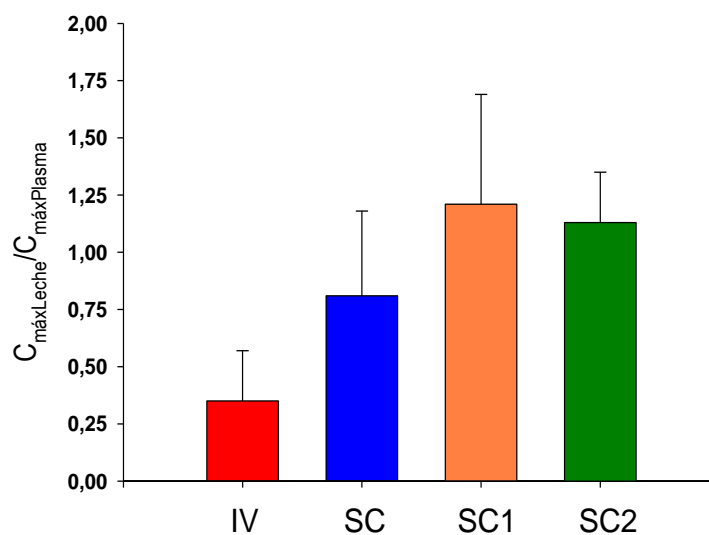


Figura 20.- Ratios $C_{\max\text{Leche}}/C_{\max\text{Plasma}}$ de marbofloxacino en leche obtenido en la cabra tras la administración via intravenosa (IV) y subcutánea (SC) a una dosis de 2 mg/kg, y via subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y via subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 6 mg/kg.

5.10.- INTEGRACIÓN FARMACOCINÉTICA/FARMACODINAMIA.

Marbofloxacino pertenece al grupo de antibacterianos cuya actividad es concentración dependiente, es decir, producen la muerte bacteriana en función de la concentración alcanzada. En consecuencia, los dos parámetros farmacocinético-farmacodinámicos (PK-PD), que mejor correlacionan el éxito clínico, tanto en el tratamiento de una infección como en la prevención de la aparición de mutantes resistentes, son la ratio entre la concentración plasmática máxima y la concentración inhibitoria mínima ($C_{m\acute{a}x}/MIC$) y la ratio entre el área bajo la curva y la concentración inhibitoria mínima (AUC/MIC), (Xuan y cols., 2001).

Con modelos animales y empleando diferentes quinolonas se ha observado que ratios $AUC/MIC \geq 100-125$ ó de $C_{m\acute{a}x}/MIC \geq 8-10$ son buenos predictores de eficacia clínica (Craig y Dalhoff, 1998; Turnidge, 1999). No obstante, hay que señalar que estos valores numéricos de AUC/MIC y $C_{m\acute{a}x}/MIC$ se han obtenido de infecciones experimentales en animales de laboratorio o en pruebas clínicas en el hombre, por lo que pueden ser o no aplicables a infecciones en cabras, o en general, a infecciones en otras especies animales (Lees y Shojaee Aliabadi, 2002a). Empero, corrigiendo las diferencias entre especies, a partir de estudios realizados con modelos animales *in vivo* se puede extrapolar y determinar el valor del parámetro PK-PD necesario para obtener eficacia antimicrobiana y minimizar la aparición de resistencias (Andes y Craig, 2002a;b Toutain y Lees, 2004).

Por otro lado, con respecto a la aparición de resistencias, la hipótesis de la ventana de selección de mutantes, así como sus límites inferior y superior (MIC y MPC respectivamente), han ganado importancia en los últimos años. Recientes estudios hacen hincapié en la importancia de nuevas estrategias de dosificación basadas en la MPC y no exclusivamente en la MIC para restringir, en la medida de lo posible, la aparición o selección de mutantes resistentes (Drlica y cols., 2003, 2007, Liu y cols., 2005).

Estudios *in vitro* e *in vivo* para modelos de infección en animales de laboratorio y humanos con *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* han demostrado la importancia de las ratios PK-PD que incluyen la MPC como estrategia de dosificación, ya que se disminuye el enriquecimiento y la amplificación de subpoblaciones no susceptibles o resistentes, mientras que dosificaciones dentro de la ventana de selección de mutantes, es decir, a concentraciones por encima de la MIC y por debajo de la MPC, si producían dicho enriquecimiento (Blondeu y cols., 2001, Liu y cols., 2005, Ciu y cols., 2206).

El índice de prevención de mutantes (ratio MPI) o MPC/MIC define el rango de concentración en el cual los mutantes resistentes pueden ser enriquecidos y amplificados selectivamente, de manera que, pequeños valores de estos ratios indican, en principio, una mejor capacidad del antibacteriano para prevenir el desarrollo de mutantes utilizando los esquemas de dosificación habituales (Drlica y cols., 2003).

En el presente estudio se ha determinado la sensibilidad a marbofloxacino frente a doce cepas de *Staphylococcus aureus* obtenidas de cabras lactantes con estafilococias crónicas intramamarias en granjas comerciales. Como cepas de referencia se utilizaron *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

De las cepas estudiadas frente a marbofloxacino, con un rango de concentraciones entre 0,03 µg/mL - 128 µg/mL, nueve presentaron MIC de 0,125 µg/mL, dos de 0,25 µg/mL y una de 0,50 µg/mL (Tabla 40). Se establece, por tanto, como MIC₉₀, un valor de 0,50 µg/mL para marbofloxacino. Las cepas de referencia han presentado un valor de MIC de 0,25 µg/mL para *S. aureus* ATCC 29213 y 0,03 µg/mL para *E. coli* ATCC 25922. En cuanto a la MPC, dos cepas presentaron MPC de 0,125 µg/mL, cuatro de 0,25 µg/mL, dos de 0,50 µg/mL y cuatro de 1,00 µg/mL (Tabla 40). Se establece, por tanto, como MPC₉₀, un valor de 1,00 µg/mL para marbofloxacino. Las cepas de referencia han presentado un valor de MPC de 0,50 µg/mL para *S. aureus* ATCC 29213 y 0,50 µg/mL para *E. coli* ATCC 25922. Los ratios MPC/MIC fueron de 2,00, 2,00 y 15,62 para las cepas de *S. aureus* aisladas de leche de cabra, *S. aureus* ATCC 29213 y *E. coli* ATCC 25922, respectivamente.

Para verificar la existencia de diferencias significativas entre los ratios obtenidos en las diferentes administraciones del fármaco, y los animales utilizados, se han realizado los estudios estadísticos no paramétricos de Kruskal-Wallis y Wilcoxon, cuyos resultados se muestran en las tablas 42 y 43 y en las figuras 21, 22, 23, 24 y 25.

Parámetros	P Todas las vías	MIC (µg/mL)	Parámetros	P Todas las vías	MIC (µg/mL)
AUC ₂₄ /MIC (h)	3,4x10 ⁻⁰⁴	0,125	AUC ₂₄ /MIC (h)	3,4x10 ⁻⁰⁴	0,25
C _{max} /MIC*	9x10 ⁻⁰²	-	C _{max} /MIC*	4,7x10 ⁻⁰⁴	-
AUC ₂₄ /MPC (h)	3,0x10 ⁻⁰⁴	0,50	AUC ₂₄ /MPC (h)	9x10 ⁻⁰²	1,00
C _{max} /MPC*	1,0x10 ⁻⁰²	-	C _{max} /MPC*	8x10 ⁻⁰²	-

P<0,05: diferencias significativas; *P*>0,05: diferencias no significativas.

* El valor de C_{max} indicado también incluye el valor de Co.

TABLA 42.- Estudio comparativo no paramétrico (H de Kruskal-Wallis) entre los principales ratios farmacocinéticos-farmacodinámicos indicadores de eficacia para Marbofloxacino frente a *S.aureus*. Resultados obtenidos tras la administración de una dosis de 2 mg/kg de marbofloxacino por vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC), y tras la administración de una dosis de 6 mg/kg de marbofloxacino por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a cabras.

Parámetros	P _{sc/IV}	P _{sc1/IV}	P _{sc2/IV}	P _{sc1/SC}	P _{sc2/SC}	P _{sc1/SC2}
MIC = 0,125 µg/mL						
AUC ₂₄ /MIC (h)	0,208	0,036	0,036	0,035	0,036	0,036
C _{max} /MIC	0,036	9x10 ⁻⁰²	0,036	0,208	0,675	9x10 ⁻⁰²
MIC ₉₀ = 0,50 µg/mL						
AUC ₂₄ /MIC(h)	0,208	0,036	0,036	0,035	0,036	0,036
C _{max} / MIC	0,036	9x10 ⁻⁰²	0,036	0,208	0,675	9x10 ⁻⁰²
MIC = 0,250 µg/mL						
AUC ₂₄ /MPC (h)	0,208	0,036	0,036	0,035	0,036	0,036
C _{max} /MPC	0,036	9x10 ⁻⁰²	0,036	0,208	0,675	9x10 ⁻⁰²
MIC ₉₀ = 1,00 µg/mL						
AUC ₂₄ /MPC (h)	0,208	0,036	0,036	0,035	0,036	0,036
C _{max} /MPC	0,036	9x10 ⁻⁰²	0,036	0,208	0,675	9x10 ⁻⁰²

P<0,05: diferencias significativas; *P*>0,05: diferencias no significativas.

TABLA 43.- Estudio comparativo no paramétrico (t de Wilcoxon) entre los principales ratios farmacocinéticos-farmacodinámicos indicadores de eficacia para Marbofloxacino frente a *S.aureus*. Resultados obtenidos tras la administración de una dosis de 2 mg/kg de marbofloxacino por vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC), y tras la administración de una dosis de 6 mg/kg de marbofloxacino por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a cabras.

Dado que la prueba de Kruskal-Wallis (Tabla 42), muestra diferencias significativas en todos los casos (*p* < 0,05), se realiza la T de Wilcoxon para muestras pareadas a fin de evaluar

cuál es el origen de esas diferencias. Como resultado de dicha prueba en los ratios AUC_{24}/MIC y AUC/MPC no se observan diferencias ($p > 0,05$) cuando se comparan las formulaciones convencionales entre si, a diferencia de las vías extravasculares donde se observan diferencias significativas en ambos parámetros. Por otro lado, en los ratios $C_{m\acute{a}x}/MIC$ y $C_{m\acute{a}x}/MPC$ se observan diferencias ($p < 0,05$) cuando se comparan las formulaciones convencionales entre si, a diferencia de la vía SC, donde se observan diferencias significativas cuando se comparan con las formulaciones SC1 y SC2

Estos resultados sólo predicen, *a priori*, el éxito clínico del tratamiento con esta quinolona para cepas con $CMI \leq 0,125 \mu\text{g/mL}$ utilizando los ratios AUC/MIC como indicadores de eficacia, sin embargo, para los ratios MPC/MIC se puede prevenir la aparición de mutantes resistentes a dosis habituales o “bajas” de marbofloxacino. En efecto, los ratios MPI son iguales a 2, esto quiere decir que no hay mucha diferencia entre la MIC y la MPC, por lo que la ventana de selección de mutantes parece ser pequeña, del orden de $0,50 \mu\text{g/mL}$ tal y como se observa en la figura 25.

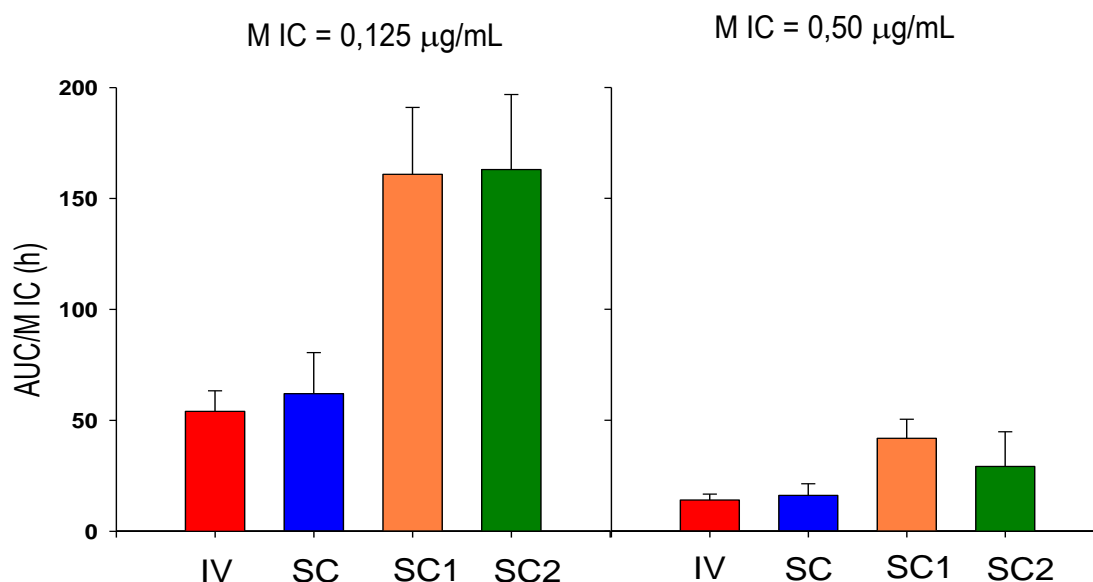


Figura 21.- Ratios AUC_{24}/MIC para marbofloxacino frente a cepas de *S.aureus* obtenidos en la cabra tras la administración vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC) a una dosis de 2 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 6 mg/kg.

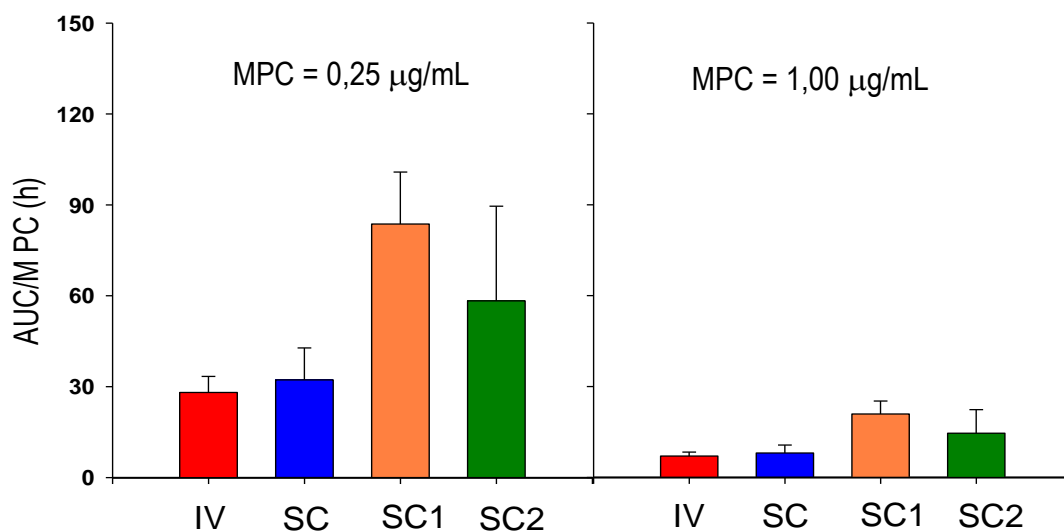


Figura 22.- Ratios AUC_{24}/MPC para marbofloxacino frente a cepas de *S.aureus* obtenidos en la cabra tras la administración vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC) a una dosis de 2 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 6 mg/kg.

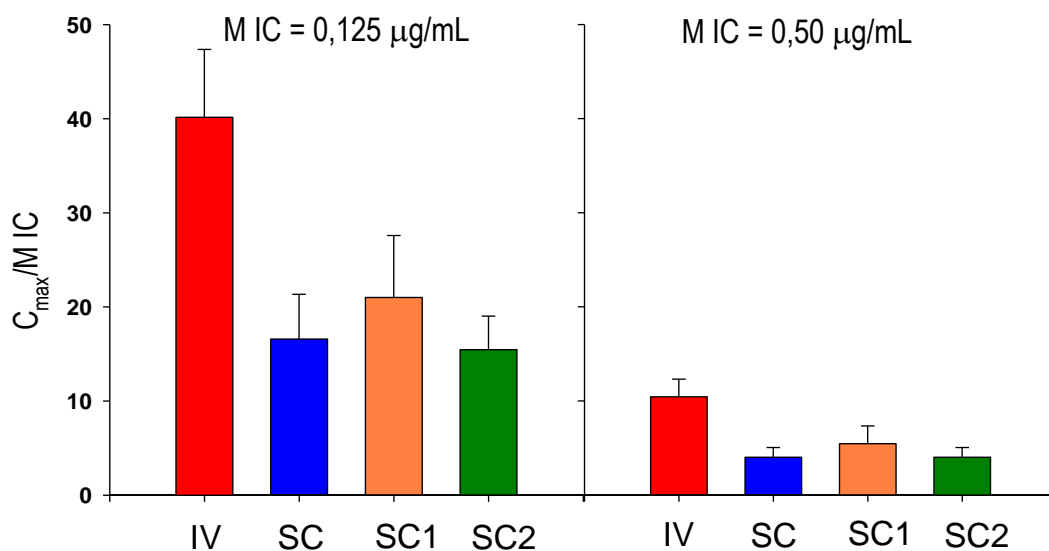


Figura 23.- Ratios $C_{m\acute{a}x}/MIC$ para marbofloxacino frente a cepas de *S.aureus* obtenidos en la cabra tras la administración vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC) a una dosis de 2 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 6 mg/kg.

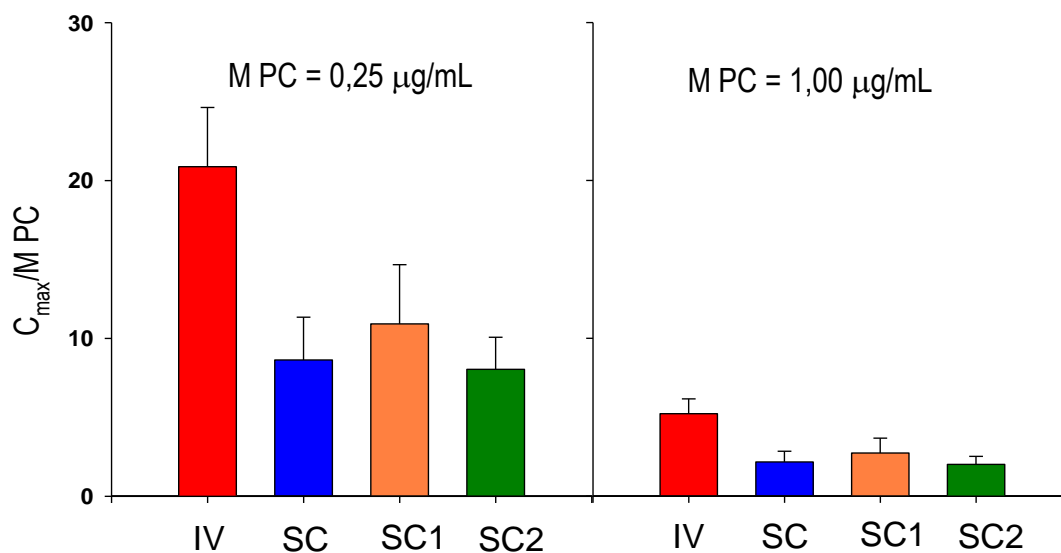


Figura 24.- Ratios C_{max}/MPC para marbofloxacino frente a cepas de *S.aureus* obtenidos en la cabra tras la administración vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC) a una dosis de 2 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 6 mg/kg.

Si observamos la figura 25 donde se presentan los niveles plasmáticos alcanzados con cada formulación, podemos identificar que con las formulaciones convencionales las concentraciones plasmáticas tan sólo se mantienen por encima de la ventana de selección de mutantes hasta las 1,5 y 2 horas respectivamente para las vías IV y SC. En cambio, para las formulaciones SC1 y SC2, se mantienen esas concentraciones hasta las 6-8 horas para cada una. Si tomamos como criterio la CMI, las concentraciones plasmáticas se mantienen por encima hasta las 4 y 6 horas respectivamente para las vías IV y SC. En cambio, para las formulaciones SC1 y SC2, se mantienen esas concentraciones hasta las 10-12 horas para cada una

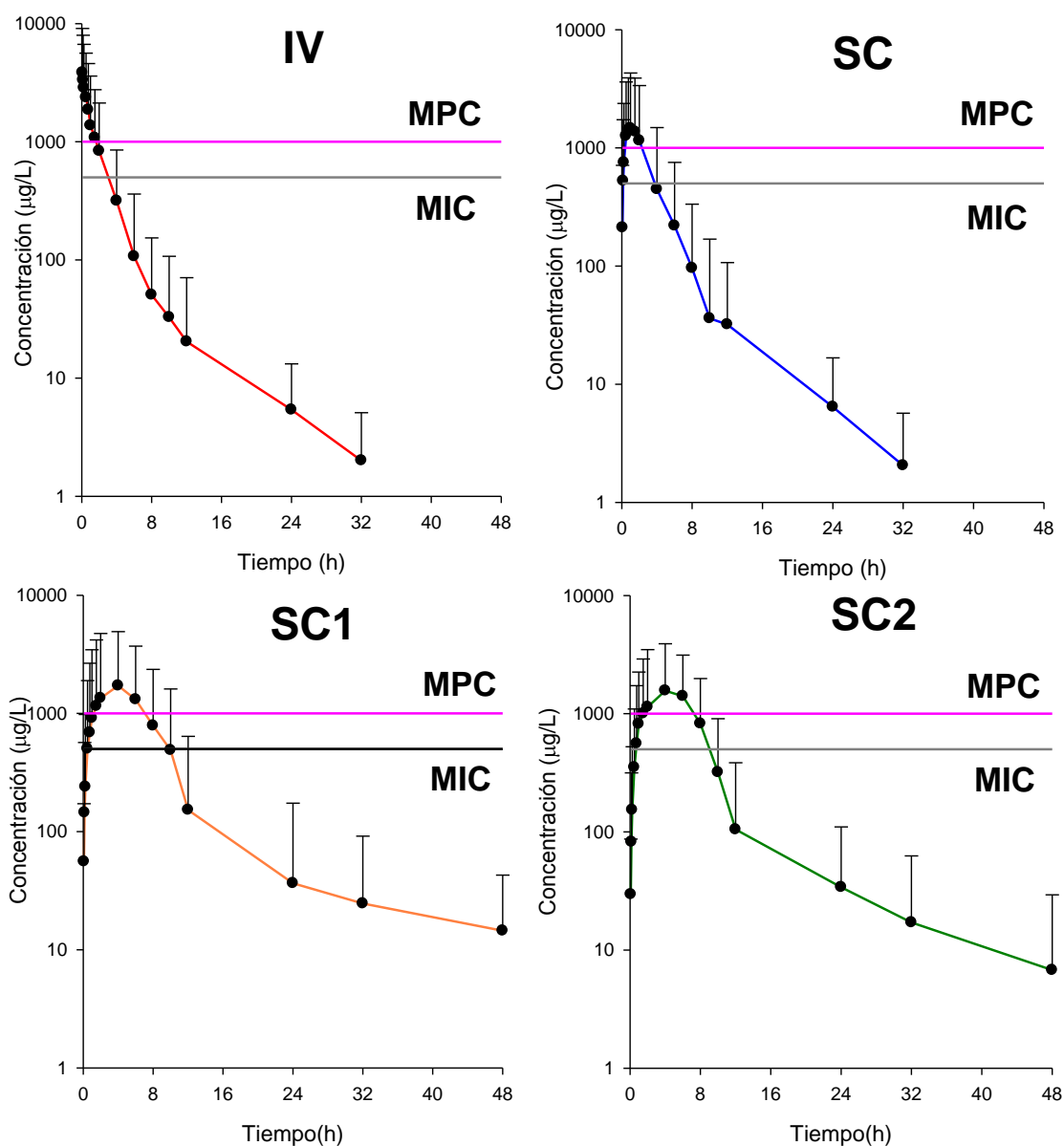


Figura 25.- Relación entre los niveles plasmáticos alcanzados y la ventana de selección de mutantes para marbofloxacin frente a cepas de *S.aureus* obtenidos en la cabra tras la administración vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC) a una dosis de 2 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 6 mg/kg.

En las especificaciones indicadas en los resúmenes de las características de los productos (fichas técnicas) de las especialidades medicamentosas comercializadas en España, el uso de marbofloxacin está autorizado para el tratamiento de diferentes infecciones en varias

especies: gato, perro, bovino y cerdo, y en los dos últimos casos para el tratamiento del síndrome Mamitis-Metritis-Agalaxia causado por cepas bacterianas sensibles. En el caso que nos ocupa, se ha empleado como producto medicamentoso convencional MARBOCYL 10 % solución inyectable para bovino y porcino (Vetoquinol Especialidades Veterinarias S.A.), donde se señala como régimen de dosificación para el tratamiento de la mamitis (en bovino) una administración subcutánea cada 24 horas (dosis 2 mg/kg) en una única inyección diaria por vía subcutánea o intramuscular durante 3 días consecutivos. Se indica también que la primera inyección puede realizarse por vía intravenosa. Atendiendo a los resultados farmacocinéticos y farmacodinámicos presentados en las tablas y figuras anteriores, y teniendo en cuenta que realizamos un uso no contemplado del medicamento de partida, la pauta indicada podría ser efectiva para las formulaciones poliméricas. Puesto que se alcanzan, y se mantienen durante más tiempo, niveles plasmáticos por encima de la MIC y la MPC. Además hay que tener en cuenta que en este tipo de tratamientos el sistema inmunitario del animal juega un papel clave que, por razones prácticas de estos estudios *in vitro*, no se tiene en cuenta aunque *in vivo* es fundamental. En efecto, estos resultados deben tomarse con precaución, ya que se establece como punto de partida alcanzar unas condiciones farmacocinéticas que favorezcan las propiedades farmacodinámicas del antibacteriano. Y estas premisas utilizadas en el estudio integrado farmacocinético-farmacodinámico, pueden no ser aplicables *in vivo* en muchos casos (Lees y Shojaee Aliabadi 2002a, Toutain y cols, 2004b). En efecto, los valores numéricos de los parámetros utilizados, ratios AUC_{24}/MIC_{90} y $C_{m\acute{a}x}/MIC_{90}$, como indicadores de eficacia clínica para predecir, establecer dosis y pautas posológicas apropiadas, se han generado en infecciones experimentales con animales de laboratorio, o en pruebas clínicas en el hombre, por lo que pueden ser o no aplicables a infecciones en cabras, o en general, a infecciones en animales (Lees y Shojaee Aliabadi, 2002a). Algunos autores han sugerido que valores de AUC/MIC, menores a 100, pueden ser apropiados en Medicina Veterinaria para animales inmunocompetentes. Lees y Shojaee Aliabadi (2002a), tras la administración de danofloxacino en varias especies rumiantes en experiencias *ex vivo* frente a diferentes microorganismos patógenos, han observado valores de AUC/MIC inferiores tal y como se muestra en la tabla siguiente:

AUC/MIC	Ternero	Oveja	Cabra	Camello
Bacteriostático	15,9 ± 2	17,8 ± 1,7	22,6 ± 1,7	17,2 ± 3,6
Bactericida	18,1 ± 1,9	20,2 ± 1,7	29,6 ± 2,5	21,2 ± 3,7
Erradicación	33,5 ± 3,5	28,7 ± 1,8	52,4 ± 8,1	68,7 ± 15,6

Otro factor a considerar es el medio de cultivo empleado para obtener las MIC y las MPC utilizadas en la integración PK-PD, el cual difiere en muchos aspectos de los fluidos biológicos (plasma y líquido intersticial). Así se encuentran diferencias en la concentración de iones (calcio y magnesio, que pueden inactivar a estos antimicrobianos mediante quelación), el pH (que puede provocar la ionización de los fármacos y por tanto su menor penetración tisular) y la concentración proteica (sólo el fármaco libre posee acción antibacteriana) entre otros. Por tanto, no se puede asumir que los valores de las MIC y MPC obtenidos *in vitro* sean idénticos a los obtenidos utilizando los mencionados fluidos biológicos (Shojaee Aliabadi y Lees, 2003, Drlıcay cols, 2007).

Otro aspecto a considerar es el hecho de que, en la mastitis, la inflamación producida en la glándula mamaria da lugar a cambios en la permeabilidad vascular y a diferencias en la composición de la leche. Generalmente el pH aumenta, disminuyen las concentraciones de caseína pero aumentan las de albúmina y el contenido en grasa también puede disminuir. Todos estos factores pueden modificar el comportamiento farmacocinético de los antimicrobianos, sin embargo, su importancia exacta aún no se comprende totalmente (Gehring y cols 2006).

Todos los resultados y premisas anteriores indican que, aunque no se puede asumir que los valores de las MIC y MPC obtenidos *in vitro* sean idénticos a los obtenidos utilizando fluidos biológicos en ensayos *ex vivo* o *in vivo*, los valores alcanzados en los indicadores de eficacia de marbofloxacino, tras su administración a la dosis de 6 mg/kg para las formulaciones SC1 y SC2, son consistentes con los niveles necesarios en plasma para alcanzar el éxito clínico frente a cepas de *S. aureus* con MIC ≤ 0,125 µg/mL.

6.-CONCLUSIONES

1.- El comportamiento farmacocinético de marbofloxacino tras su administración intravenosa (formulación IV) y subcutánea (formulación SC) en cabra, a una dosis única de 2 mg/kg, y tras su administración subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (formulación SC1) y en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% (formulación SC2), a una dosis de 6 mg/kg se ajusta a un modelo bicompartimental abierto. Las ecuaciones que los representan son las siguientes:

$$1. \text{ IV: } C = 3593,22 \cdot e^{-0,65 \cdot t} + 178,85 \cdot e^{-0,14 \cdot t} \quad \mu\text{g/L}$$

$$2. \text{ SC: } C = 8526,83 \cdot e^{-0,57 \cdot t} + 208,36 \cdot e^{-0,10 \cdot t} - 8735,19 \cdot e^{-1,42 \cdot t} \quad \mu\text{g/L}$$

$$3. \text{ SC1: } C = 77123,00 \cdot e^{-0,33 \cdot t} + 101,25 \cdot e^{-0,04 \cdot t} - 87667,00 \cdot e^{-0,51 \cdot t} \quad \mu\text{g/L}$$

$$4. \text{ SC2: } C = 29163,40 \cdot e^{-0,29 \cdot t} + 58,47 \cdot e^{-0,05 \cdot t} - 64248,00 \cdot e^{-0,40 \cdot t} \quad \mu\text{g/L}$$

2.- Las semividas en la fase terminal ($t_{1/2\lambda_z}$) obtenidas para marbofloxacino para las diferentes vías de administración y formulaciones son: IV (5,61 h), SC (6,77 h), SC1 (14,26 h) y SC2 (16,25 h), son significativamente diferentes en las formulaciones poliméricas. Por otro lado, el MRT, adquiere, respectivamente, los siguientes valores: 2,94 h (IV), 4,15 h (SC), 9,14 h (SC1) y 8,24 h (SC2). La permanencia de marbofloxacino resulta ser entre 2 – 3 veces superior tras la administración subcutánea SC1 y SC2 lo que permite obtener concentraciones plasmáticas durante un mayor tiempo.

3.- La depuración plasmática de marbofloxacino en cabra medida por el aclaramiento corporal (Cl) adquiere un valor de 0,29 L/kg/h.

4.- Los valores del volumen de distribución aparente de marbofloxacino en el compartimento central ($V_c = 0,52$ L/kg) en el estado estacionario ($V_{ss} = 0,85$ L/kg) y en función del área bajo la curva ($V_z = 2,57$ L/kg) indican que existe una buena distribución del fármaco y un buen acceso a los tejidos y fluidos en esta especie.

5.- Las constantes de absorción obtenidas para enrofloxacino han sido de: $1,42 \text{ h}^{-1}$ (formulación SC), $0,51 \text{ h}^{-1}$ (formulación SC1) y $0,40 \text{ h}^{-1}$ (formulación SC2), significativamente menores en las formulaciones de liberación sostenida, frente a una absorción muy rápida en la formulación convencional. Estos resultados están en concordancia los obtenidos para el tiempo medio de absorción MAT con valores de 1,21 h, 6,20 h y 5,301 h para las formulaciones SC, SC1 y SC2 respectivamente.

6.- Las concentraciones plasmáticas máximas ($C_{\text{máx}}$), obtenidas para marbofloxacino para las tres formulaciones administradas por vía subcutánea (SC, SC1 y SC2) en cabra, son estadísticamente iguales entre ellas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la administración de las formulaciones de liberación sostenida (SC1 y SC2) se hizo a una dosis 3 veces superior a la formulación convencional (SC). Al corregir los valores de $C_{\text{máx}}$, a igualdad de dosis, se aprecian diferencias significativas entre los valores obtenidos de la formulación convencional frente a las de liberación sostenida. Además, también existen diferencias estadísticamente significativas para el tiempo en que se alcanza dicha concentración máxima ($T_{\text{máx}}$) entre las distintas administraciones 1,08 h (SC), 3,00 h (SC1) y 4,00 h (SC2).

7.- La biodisponibilidad (F) de marbofloxacino, tras su administración SC en cabra es del 108,08%. Valores similares resultan cuando se administran, vía subcutánea, las formulaciones de liberación sostenida 101,58% (SC1) y 87,64% (SC2) no existiendo diferencias significativas ($P < 0,05$) entre estos valores de F.

8.- La evaluación de la absorción mediante deconvolución numérica pone de manifiesto importantes diferencias en las velocidades de absorción para cada formulación, con valores de 103,42 mg/h (SC), 63,41 mg/h (SC1) y 50,07 mg/h (SC2). La fracción absorbida para cada una fue de 1,13, 1,03 y 0,80 respectivamente. Por otro lado, el 90% de marbofloxacino se ha absorbido al cabo de un tiempo promedio de 2,93 h (SC), 11,23 h (SC1) y 9,02 h (SC2). Estos resultados sugieren de forma coherente un retraso en la absorción para las formulaciones de liberación sostenida respecto la formulación convencional.

10.- Con los resultados obtenidos, y teniendo en cuenta la farmacocinética en plasma, la diferencia en las semividas de eliminación en la fase terminal ($t_{1/2\lambda z}$) indica que, las fases de ingreso parecen condicionar las fases de disposición (sobre todo la eliminación en la fase terminal) en función del tipo de formulación empleada.

10.- Los valores de los ratios $C_{\text{máx leche}}/C_{\text{máx plasma}}$ y $AUC_{\text{máx leche}}/AUC_{\text{máx plasma}}$, son cercanos a uno en todos los casos para las vías extravasculares, e indican que el fármaco tiene cierto acceso desde el plasma hacia la leche, que se refleja en unos porcentajes de excreción que van desde el 1,02%, de la dosis administrada para la vía IV, hasta el 0,64%, 0,77% y 0,56 % de las dosis administradas para la vías SC, SC1 y SC2 respectivamente hasta las 48 horas. Por otro lado, el valor del MRT_{leche} , indica que la presencia de marbofloxacino en leche puede ser más prolongada cuando se administra en las formulaciones SC1 y SC2.

11.- Con los datos de MIC de marbofloxacino, determinados *in vitro* frente a cepas específicas de *Staphylococcus aureus*, y teniendo en cuenta los índices $C_{\text{máx}}/\text{MIC}$ y AUC/MIC establecidos como indicadores de eficacia clínica, y también de la potencia del fármaco, se puede concluir que la administración de una dosis de 6 mg/kg por vía subcutánea con las dos formulaciones SC1 y SC2 podría ser efectiva contra aislados bacterianos con $\text{MIC} \leq 0,125$ $\mu\text{g/mL}$. Por otro lado, los datos de CPM, del índice MPI y de la ventana de selección de mutantes, indican que, a las dosis habituales podrían prevenirse la aparición de mutantes resistentes, y en particular, con las formulaciones SC1 y SC2 a una dosis de 6 mg/kg.

7.-RESUMEN

Se ha estudiado el comportamiento cinético de marbofloxacino en cabras tras la administración por las vías intravenosa y subcutánea de una dosis de 2 mg/kg, y tras la administración en solución del polímero P407 al 25% y en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2% por vía subcutánea a la dosis de 6 mg/kg.

La determinación de marbofloxacino en plasma y leche se realizó mediante HPLC con detección fluorescente, siguiendo el método descrito por Siefert y cols. (1999). El ajuste a métodos farmacocinéticos compartimentales y no compartimentales se realizó mediante el programa WinNonlin Professional®. Marbofloxacino se distribuye según un modelo bicompartimental abierto, tanto por vía intravenosa como por vía subcutánea en los tres casos.

Tras la administración intravenosa, la vida media obtenida para el enrofloxacino ($t_{1/2\alpha}$) fue de 5,61 h con un tiempo medio de residencia (MRT) de 2,95 h. Los volúmenes aparentes de distribución calculados para el compartimento central (V_c), en estado estacionario (V_{ss}) y en función del área bajo la curva (V_z) resultaron ser de 0,52 L/kg, 0,85 L/kg y 2,57 L/kg respectivamente, indicando una amplia distribución orgánica. En cuanto al aclaramiento plasmático (Cl), éste alcanzó un valor de 0,29 L/kg/h.

La formulación convencional por vía subcutánea, así como las dos formulaciones de liberación sostenida (en solución del polímero P407 al 25% y en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2%), ambas también por vía subcutánea, nos permitieron registrar los siguientes tiempos de semivida: 6,77 h, 14,26 h y 16,56 h, respectivamente, con unos valores de MRT de 4,15 h, 9,14 h y 8,24 h, respectivamente.

La biodisponibilidad de marbofloxacino en la formulación convencional alcanzó un valor de 108 %. Valores similares se obtuvieron cuando se administró por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% y en solución del polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2%, que fueron de 101,58 % y 78,64 %, respectivamente.

La absorción *in vivo* de marbofloxacino desde las formulaciones convencional y de liberación sostenida fue evaluada mediante deconvolución numérica y métodos no compartimentales. En el caso de la deconvolución numérica, las velocidades de absorción calculadas y la cantidad acumulada en términos de fracción absorbida para las formulaciones SC, SC-P407 y SC-P407-CMC fueron de $106,42 \pm 38,76$ mg/h a $0,48 \pm 0,23$ h, $63,41 \pm 10,73$ mg/h a $1,44 \pm 0,76$ h y $50,07 \pm 13,87$ mg/h a $1,92 \pm 0,76$ h, $1,13 \pm 0,25$, $1,03 \pm 0,22$ y $0,80 \pm 0,17$, respectivamente. Mediante la aproximación no compartimental sólo se obtuvieron valores

de MAT superiores al MRT_{IV} (2,94 h) para las formulaciones SC-P407 (6.20 h) y SC-P407-CMC (5.30 h). Estos resultados indican que las diferencias en las velocidades de eliminación y en los tiempos medios de residencia pueden ser debidas a diferencias en los procesos de absorción.

Se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias de marbofloxacino, frente a cepas de *Staphylococcus aureus* a fin de determinar los índices farmacocinético-farmacodinámicos óptimos. De dicho estudio se puede concluir que una dosis de 6 mg/kg podría ser efectiva por vía subcutánea cuando se administre junto con polímero P407 al 25% o junto con polímero P407 al 25% + carboximetilcelulosa al 2%, en cabras contra aislados bacterianos con $MIC \leq 0,125 \mu\text{g/mL}$.

Se determinaron la concentración preventiva de mutantes (MPC), el índice de prevención de mutantes (MPI) y la ventana de selección de mutantes para marbofloxacino frente a cepas mamíticas de *Staphylococcus aureus*. Con estos datos, los niveles de fármaco requeridos para alcanzar niveles equivalentes a la MPC podrían ser obtenidos fácilmente con marbofloxacino, y dosificaciones para alcanzar la MPC podrían ser efectivas para reducir la aparición de subpoblaciones resistentes de *S.aureus* con susceptibilidad reducida a las fluoroquinolonas.

El antibacteriano utilizado en este estudio, mostró una buena penetración en leche, con un perfil plasmático muy similar, mostrando relaciones $C_{Maxleche}/C_{Maxplasma}$ and $AUC_{leche}/AUC_{plasma} < 1$ o similares.

8.-SUMMARY

The pharmacokinetics of marbofloxacin was studied following intravenous and subcutaneous administration of single doses of 2 mg/kg to healthy goats, and as a long-acting poloxamer 407 gel formulation and poloxamer 407 + carboxymethylcellulose.

Plasma concentrations were determined by HPLC assay with fluorescence detection following the method described by Siefert et al. (1999). The fitting to compartmental and non compartmental pharmacokinetic methods was carried out by using WinNonlin Professional® software. The marbofloxacin plasma concentration versus time data after intravenous and extravascular administrations could best be described by a two compartment open model.

The marbofloxacin terminal half-life ($t_{1/2\lambda z}$) was 5,61 h after intravenous administration, with a mean residence time (MRT) of 2,94 h. The apparent volumes of distribution calculated for central compartment (V_c) at steady-state (V_{ss}) and by the area method (V_z) were 0,52; 0,85 and 2,57 L/kg, respectively, indicating a wide body distribution. Total body clearance was 0,29 L/kg/h.

After extravascular administrations, terminal half-lives were 6,77; 14,26 and 16,25 h for marbofloxacin administration subcutaneously for conventional formulation and for long-acting poloxamer 407 gel formulation and with poloxamer 407 + carboxymethylcellulose, respectively. MRT values obtained were 4,15; 9,14 and 8,24 h respectively.

Absolute bioavailability was 108,08 % after marbofloxacin subcutaneous administration of conventional formulation. Similar values were obtained, 101,58 % and 78,64 %, after marbofloxacin administration subcutaneously with long-acting poloxamer 407 gel formulation and with poloxamer 407 + carboxymethylcellulose, respectively.

The *in vivo* marbofloxacin absorption rate from conventional and poloxamer formulations were stimulated by non-compartmental method and numeric deconvolution. In the case of numeric deconvolution, the calculated absorption rates and the cumulative absorption in terms of fraction input SC, SC-P407 and SC-P407-CMC formulations were 106.42 ± 38.76 mg/h at 0.48 ± 0.23 h, 63.41 ± 10.73 mg/h at 1.44 ± 0.76 h and 50.07 ± 13.87 mg/h at 1.92 ± 0.76 h, 1.13 ± 0.25 , 1.03 ± 0.22 and 0.80 ± 0.17 , respectively. From non-compartmental approach, only the MAT values for SC-P407 (6.20 h) and SC-P407-CMC (5.30 h) were higher than MRT_{IV} (2.94 h). These results show that the differences on elimination rate constants and mean residence times between conventional and poloxamer formulations must be due to differences on the absorption process.

Summary

Minimal inhibitory concentrations (MIC) assays of marbofloxacin against different strains of *Staphylococcus aureus* were performed in order to compute pharmacodynamic surrogate markers. From these data, it is concluded that a 6 mg/kg dose of marbofloxacin would be effective by subcutaneous administration in solution of long-acting poloxamer 407 gel formulation and with poloxamer 407 + carboxymethylcellulose subcutaneous administration to goats against bacterial isolates with $MIC \leq 0,125 \mu\text{g/mL}$.

Mutant prevention concentrations (MPC), mutant prevention index (MPI) and mutant selection windows of marbofloxacin against different strains of *Staphylococcus aureus* were obtained. From these data, drug levels required to achieve MPC conditions should readily be attained with marbofloxacin and dosing to achieve MPC concentrations could be effective to reduce the selection of bacterial subpopulations of *S.aureus* with reduced fluoroquinolone susceptibility.

The antibacterial drug used in this study allowed a good penetration in milk, with a concentration-time profile in milk closely paralleled the plasma profile, showing relationships $C_{\text{Maxmilk}}/C_{\text{Maxplasma}}$ and $AUC_{\text{milk}}/AUC_{\text{plasma}} < 1$ or similar.

Summary

9.-BIBLIOGRAFÍA

ABELSON, M.B. & HALLAS, S.J., 2003: The new antibiotics: The path of least resistance. *Ophthalmol.*, 10: 47-49.

ABD EL-ATY, A.M., & GOUDAH, A., 2002. Some pharmacokinetic parameters of pefloxacin in lactating goats. *Veterinary Research Communications* 26, 553-61.

ABO EL-SOUD, K.A., 2003. Influence of albendazole on the disposition kinetics and milk antimicrobial equivalent activity of enrofloxacin in lactating goats. *Pharmacological Research* 48: 389-395.

ABO EL-SOUD, K.A., & GOUDAH, A., 2009. Influence of *Pasteurella multocida* infection on the pharmacokinetic behavior of marbofloxacin after intravenous and intramuscular administrations in rabbits. *Journal of Veterinary Pharmacological Therapy* 33, 63–68.

ABRAHAM, S., FURTADO, S., BHARATH, S., BASAVARAJ, B.V., DEVESWARAN, R., & MADHAVAN, V., 2009 Sustained ophthalmic delivery of ofloxacin from an ion-activated in situ gelling system. *Pak J Pharm Sci*:22(2):175-9.

AEMPS, 2012. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.

<https://sinaem4.agemed.es/consavetPub/fichasTecnicas.do?metodo=detalle> For. Información técnica acerca de marbofloxacino, danofloxacino, enrofloxacino, flumequina y ácido oxolínico proporcionada por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios.

AESCHLIMANN, J.R., 2003: The role of multidrug efflux pumps in the antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. *Pharmacotherapy*, 23(7): 916-924.

AKTIPIS, S. 2000. DNA I: Estructura y conformación. En: *Bioquímica*. Barcelona Ed: Devlin TM. 3ª ed. Reverté, S.A. (Vol 2): 592-595.

ÁLAMO, L. Estudio farmacocinético de marbofloxacino en conejos. 2012. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.

ALBARELOS. G.A., MONTIYA. L., & LANDONI. M.F. 2005, Pharmacokinetics of marbofloxacin after single intravenous and repeat oral administration to cats *The Veterinary Journal*; 170: 222–229

ALIABADI, F.S., & LEES, P., 2001. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of danofloxacin in serum and tissue fluids of goats following intravenous and intramuscular administration. *Am. J. Vet. Res.*, 62 (12): 1979-1989.

ALIABADI, F.S., & LEES, P., 2002. Pharmacokinetics and pharmacokinetic/pharmacodynamic integration of marbofloxacin in calf serum, exudate and transudate. *Journal of Veterinary Pharmacological Therapy* 25, 161–174.

AMINIMANIZANI, A., BERINGER, P., & JELLIFFE, R., 2001. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of the newer fluorquinolone antibacterials. *Clinical Pharmacokinetics* 40, 169-187.

ANDES, D. & CRAIG, W.A., 2002a. Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: a critical review. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 19: 261-268.

ANDES, D. & CRAIG, W.A., 2002b. Pharmacodynamics of the new fluoroquinolone gatifloxacin in murine thigh and lung infection models. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 1665–1670.

ANDRIOLE, V.T., 1998. The quinolones prospects. In: Andriole, V.T. (Ed): *The Quinolones*. Academic Press, San Diego California, pp 417-29.

APPELBAUM, P. C., PANKUCH, G.A., BOZDOGAN, B., LIN, G., JACOBS, M.R., PATEL, M.V., GUPTA, S.V., JAFRI, M.A., DE SOUZA, N.J. & KHORAKIWALA, H.F., 2005. Activity of the new quinolone WCK 771 against pneumococci. *Clin.Microbiol.Infect.* 11:9-14.

APPELBAUM, P.C., & HUNTER, P.A., 2000. The fluorquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents* 16, 5-15.

ARAKI, H., OGAKE, N., MINAMI, S., WATANABE, Y., NARITA, H., TAMAI, I., & TSUJI, A., 1997. Application of muscle microdialysis to evaluate the concentrations of the fluoroquinolones pazufloxacin and ofloxacin in the tissue interstitial fluids of rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 49, 1141–1144.

ADEF, M., EL-BANNA, HA., ABD EL-ATY, AM., & GOUDAH, A., 2002. Pharmacokinetics of difloxacin in goats. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 109: 320-323.

ATKINSON, A.J.Jr. & KUSHNER, W., 1979: *Clinical Pharmacokinetics*. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 19: 105-127.

ATKINSON, H & BEGG, E., 1990. Prediction of drug distribution into human milk from physicochemical characteristics. *Clin. Pharmacokinet.*, 18: 151-167.

AZANZA, J.R., SÁDABA, B., MEDIAVILLA, A. & FLÓREZ, J., 2003: *Quinolonas. Sulfamidas. Trimetoprima. Cotrimoxazol. Nitrofurantoína. Antisépticos*. En: *Farmacología humana*. 4º ed. Ed: Flórez J. Masson, S.A. Barcelona. pp: 1169-1186.

BAHK, J.Y., HYUN, J.S., LEE, J.Y., KIM, J., CHO, Y.H., LEE, J.H., PARK, J.S., & KIM, M.O., 2000. Concentration of ofloxacin in canine prostate tissue and prostate fluid after intraprostatic injection of biodegradable sustained-releasing microspheres containing ofloxacin *J Urol.*;163(5):1560-4.

BALL, P., 1986. Ciprofloxacin: an overview of adverse experiments. *J Antimicrob Chemother* 18 (Suppl. D); 187-193.

BALL, P., 2000. Quinolone generations: natural history or natural selection? *J. Antimicrob. Chemother.*, 46 (T1): 17-24.

BARONI, E. E., RODRÍGUEZ, C., CRUDELI, G., PERONE, C., RUBIO, S., DE LUCAS, J., J., & SAN ANDRÉS, M. I., 2007 Pharmacokinetics of marbofloxacin, after single intravenous administrations, in buffaloes calves. *Italian Journal Animal Science* 6(2): 838-841.

BARUAH, H., ROY, DC., ROY, RK., & KHONIKOR, HN., 2004. Pharmacokinetics, tissue residue and plasma protein binding of ofloxacin in goats. *J. Vet. Sci.* 5 (2): 97-101.

BEARDEN, D.T. & DANZIGER, L.H., 2001: Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Pharmacotherapy*; 21(10s): 224s-232s.

BERGOGNE-BEREZIN, E., 2002. Clinical role of protein binding of quinolones. *Clinical Pharmacokinetics* 41, 741-750.

BEYER, R., PESTOVA, E., MILLICHAP, J.J., STOSOR, V., NOSKIN, G.A. & PETERSON, L.R., 2000: A convenient assay for estimating the possible involvement of efflux of fluoroquinolones by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*: evidence for diminished moxifloxacin, sparfloxacin, and trovafloxacin efflux. *Antimicrob. Agents Chemoter.*, 44(3): 798-801.

BLANCO, J. E., BLANCO, M., MORA A. & BLANCO J., 1997: Prevalence of bacterial resistance to quinolones and other antimicrobials among avian *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens in Spain. *J. Clin. Microbiol.*, 35(8): 2184-2185.

BLONDEAU, J.M., HANSEN, G., METZLER, K. & HEDLIN, P., 2004: The role of PK/PD parameters to avoid selection and increase of resistance: mutant prevention concentration. *J. Chemother.*, 16 (Suppl3):1-19.

BOSWELL, F.J., ANDREWS, J.M. & WISE, R., 1997: Pharmacodynamic properties of BAY 12-8039 on gram positive and gram negative organisms as demonstrated by studies of time-kill kinetics and postantibiotic effect. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41:1377-79.

BOSWELL, F.J., ANDREWS, J.M., WISE, R. & DALHOFF, A., 1999: Bactericidal properties of moxifloxacin and post-antibiotic effect. *J. Antimicrob. Chemother.*, 43: 43-49.

BOUSQUET-MELOU, A., BERNAND, S, SCHNEIDER, M., & TOUTAIN, P, L., 2002. Pharmacokinetics of marbofloxacin in horses *Equine veterinary Journal*. 34 (4) 366-372

BROWN, S.A., 1996. Fluorquinolones in animal health. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*; 19 1-14.

BURGMANN, P., 2000. Antimicrobial Drug Use in Rodents, Rabbits, and Ferrets. En: *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 3ª ed. Ed: Prescott JF, Baggot JD y Walker RD, Blackwell Scientific Publications. Iowa. Pág: 674-675.

CABANES, A., ARBOIX, M., GARCÍA ANTON, J.M., & REIG, F., 1992. Pharmacokinetics of enrofloxacin after intravenous and intramuscular injection in rabbits. *American Journal of Veterinary Research.*; 53 (11): 2090-2093.

CÁRCELES, CM., SERRANO, JM., MARÍN, P., ESCUDERO, E. & FERNÁNDEZ-VARÓN, E., 2006. Pharmacokinetics of moxifloxacin in rabbits after intravenous, subcutaneous and a long-acting poloxamer 407 gel formulation administration. *J. Vet. Med*, 53, 300-304.

CARPENTER, J.W., HUNTER, R.P., OLSEN, J.H., HENRY, H., ISAZA, R., KOCH, D.E., 2006: Pharmacokinetics of marbofloxacin in blue and gold macaws. *AJVR*, 67 (6): 947-950.

CARPENTER, J.W., POLLOCK, C.G., KOCH, D.E., & HUNTER, R.P., 2009: Single and multiple-dose pharmacokinetics of marbofloxacin after oral administration to rabbits. *AJVR*, 70 (4): 522-526

CARRETERO, M., RODRIGUEZ, C., SAN ANDRES, M.I., FORES, P., DE LUCAS, J.J., NIETO, J., SAN ANDRES, M.D., & GONZALEZ, F., 2002. Pharmacokinetics of marbofloxacin in mature horses after single intravenous and intramuscular administration. *Equine Veterinary Journal* 34, 360–365.

CESTER, C.C., SCHNEIDER, M., & TOUTAIN, P.L., 1996. Comparative kinetics of two orally administered fluoroquinolones in dog: Enrofloxacin versus Marbofloxacin. *Revue de Medecine Veterinaire.*; 147 (10): 703-716.

CHALUMEAU, M., TONNELIER, S., D'ATHIS, P., TRELUYER, J.M., GENDREL, D., BREART, G & PONS, G., 2003: Fluoroquinolone safety in pediatric patients: A prospective, multicenter, comparative cohort study in France. *Pediatrics*, 111: 714-719.

CHAN, C., AU-YEANG, C., YEW, W., LEUNG, C. & CHENG, A., 2004: In vitro postantibiotic effects of rifapentine, isoniazid, and moxifloxacin against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48 (1): 340-343.

CHAPMAN, J. & GEORGOPAPADAKOU, N.H., 1988: Routes of quinolone permeation in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemoter.*, 4: 438-442.

CUI J, LIU Y, WANG R et al. The mutant selection window demonstrated in rabbits infected with *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 2006; 194: 1601–1608.

COHEN, S.P., McMURRY, L.M., HOOPER, D.C., WOLFSON, J.S. & LEVY S.B., 1989. Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple-antibiotic-resistant (Mar) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition to OmpF reduction. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33 (8): 1318-1325.

COHEN, J.S., 2001: Peripheral neuropathy associated with fluoroquinolones. *Ann. Pharmacother.*, 35(12): 1540-7.

COKE, R.L., ISASZA, R., KOCH, D.E., PELLERIN, M.A., & HUNTER, R.P., 2006: Preliminary single dose pharmacokinetics of marbofloxacin in ball pythions (*Python regius*). *Zoo Wildi Med.*, 37(1): 6-10.

CORRALES, J.C., CONTRERAS, A., SÁNCHEZ, A., LUENGO, C., Y MARCO, J.C., 1997. Etiología y diagnóstico microbiológico de las mamitis caprinas. En: *Mamitis caprina*. *Ovis*, 53: 33-66.

COSTERTON, J.W., STEWART, P.S., & GREENBERG, E.P., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318–1322.

COULET, M., MORELLO, C., COX, P., & LOHUIS, J., 2005. Pharmacokinetics of ibafloxacin in healthy cats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 28, 37–44.

COX, S.K., COTTRELL, M.B., SMITH, L., PAPICH, M.G., FRAZIER, D.L., & BARTGES, J., 2004. Allometric analysis of ciprofloxacin and enrofloxacin pharmacokinetics across species. *Journal of Veterinary Pharmacological and Therapeutics* 27, 139–146.

COX, S.K. Allometric scaling of marbofloxacin, moxifloxacin, danofloxacin and difloxacin pharmacokinetics: a retrospective analysis. 2007 . *Journal of Veterinary Pharmacological and Therapeutics* 30, 381–386.

CRAIG, W.A., & DALHOFF, A., 1998. Pharmacodynamics of fluoroquinolones in experimental animals. In: Born, G.V.R., Cuatrecas, P., Ganten, D., Herken, H., Melmon, K.L., Starke, K. (Eds.), *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer, Berlin, pp. 208–232.

CRAIG, W.A., 1998. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clinical Infectious Diseases* 26, 1–10.

CRAIG, W. A., 2001: Does the Dose Matter? *Clin. Infect. Dis.*, 33(3): S233-237.

CROISIER, D., ETIENNE, M., BERGOIN, E., CHARLES, P-E, LEQUEU, C., PIROTH, L., PORTIER, H. & CHAVANET, P., 2004: Mutant selection window in levofloxacin and moxifloxacin treatments of experimental pneumococcal pneumonia in a rabbit model of human therapy. *Antimicrob. Agents Chemoter.*, 48(5): 1699-1707.

DAJCS, J.J., THIBODEAUX, B.A., MARQUART, M.E., GIRGIS, D.O., TRAIDEJ, M. & O'CALLAGHAN R.J., 2004: Effectiveness of ciprofloxacin, levofloxacin, or moxifloxacin for treatment of experimental *Staphylococcus aureus* keratitis. *Antimicrob. Agents Chemoter.*, 48(6): 1948-1952.

DÁMASO, D., 1990. *Antibacterianos*. Ed. Marketing Pharm, S.A. Madrid. Pág: 13-17 y 533-584.

DE LA CAMPA A.G., BALSALOBRE, L., ARDANUY, C., FENOLL, A., PEREZ-TRALLERO, E., LIÑARES, J. & THE SPANISH PNEUMOCOCCAL INFECTION STUDY NETWORK G03/103, 2004: Fluoroquinolone resistance in penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* clones, Spain. *Emerg. Infect. Dis.*, 10(10): 1751-1759.

DE LUCAS, J.J., RODRIGUEZ, C., WAXMAN, S., GONZALEZ, F., URIARTE, I., & SAN ANDRES, M.I., 2007 : Pharmacokinetic of marbofloxacin after intravenous and intramuscular administration to ostriches. *The Veterinary Journal*. 170 : 364-368.

DING. H., LI. Y., CHEN. Z., RIZWAN-UL-HAQ. M., & ZENG. Z., 2010. Plasma and tissue cage fluid pharmacokinetics of marbofloxacin after intravenous, intramuscular, and oral single-dose application in pigs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics.*; 33: 507-510.

DOMAGALA, J.M., 1994: Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials. *J. Antimicrob. Chemothe*; 33: 685-706.

DOMÉNECH BERROZPE, J., MARTÍNEZ LANAO, J., Y PLÁ DELFINA, J.M., 1997. *Biofarmacia y Farmacocinética*. Ed. Síntesis S.A., Madrid. Volumen 1. Páginas: 35, 94-115, 278 392-420.

DOUGHERTY, T.H., BEAULIEU, D. & BARRETT, J.F., 2001: New quinolones and the impact on resistance. *DDT.*, 6(10): 529-536 .

DOUNIS, E., KORAKIS, T., ANASTASIADIS, A., KANELLAKOPOULOU, K., ANDREOPOULOS, A., & GIAMARELLOU, H., 1996. Sustained release of fleroxacin in vitro from lactic acid polymer. *Bull Hosp Jt Dis.*;55(1):16-9.

DRLICA K, & ZHAO X. Mutant selection window hypothesis updated. 2007. *Clin Infect Dis*; 44: 681–688.

DRLICA K. The mutant selection window and antimicrobial resistance. 2003. *J Antimicrob Chemother*; 52: 11–17.

DRUSANO, G.L., JOHNSON, D.E., ROSEN, M., & STANDIFORD, H.C., 1993. Pharmacodynamics of a fluoroquinolone antimicrobial agent in a neutropenic rat model of *Pseudomonas* sepsis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37, 483–490.

DRUSANO, G.L., 2002. Pharmacodynamics of fluoroquinolones. In: *Proceedings of the 10th ISAP Symposium: Pharmacokinetics and Pharmacodynamics (PK/PD): Towards Definitive Criteria*. Milan, Italy, April 27–28.

DUNBAR, L.M., WUNDERINK, R.G., HABIB, M.P., SMITH, L.G. TENNENBERG, A.M., KHASHAB, M.M., WIESINGER, B.A., XIANG, J.X., ZADEIKIS, N. & KAHN J.B., 2003: High-dose, short-course levofloxacin for community-acquired pneumonia: a new treatment paradigm. *Clin. Infect. Dis.*, 37: 752-760.

DURHAM EJ, AMYES SGB, DALHOFF A Y THOMSON CJ. 2000. Mecanismo de actividad de moxifloxacino frente a *Staphylococcus aureus* in vitro. En: *Moxifloxacino en la práctica*, volumen 1. Ed: Adam D y Finch R, Prous Science. S.A. Barcelona, pp: 61-74

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA) – 2012. WWW.EMA.EUROPA.EU/

Información técnica acerca de difloxacino, ibafloxacino, sarafloxacino, enrofloxacino y flumequina, proporcionada por la Agencia Europea del Medicamento y expuesta en su página web.

EMMERSON, A.M. & JONES, A.M., 2003. The quinolones: decades of development and use. *J. Antimicrob. Chemother.* 51(S1): 13–20.

ESCUDERO, E., CÁRCELES, CM., FERNÁNDEZ-VARÓN, E., MARÍN, P., & BENCHAOUI, H., 2007. Pharmacokinetics of danofloxacin 18% in lactating sheep and goats. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 30: 572-577.

ESCUDERO, E., MARÍN, P., CÁRCELES, CM., RAMIREZ, M.J., & FERNÁNDEZ-VARÓN, E., 2011, Pharmacokinetic and milk penetration of a difloxacin long-acting poloxamer gel formulation with carboxy-methylcellulose in lactating goats. *The Veterinary Journal*, 188 (1): 92-95.

ESPADA, M. & AVENDAÑO, C. 1993. Fármacos que actúan sobre receptores intracelulares (II). Fármacos que interaccionan con los ácidos nucleicos. En: *Introducción a la química farmacéutica*. 1º ed. Ed: Avendaño C, Interamericana-McGraw-Hill. Madrid. Pág: 525-548.

EPSTEIN, B.J., GUMS, J.G. & DRLICA, K., 2004: The changing face of antibiotic prescribing: the mutant selection window. *Ann. Pharmacother.*, 38: 1675-1682 .

FANG, W. & PYÖRÄLÄ S., 2006. Mastitis-causing *Escherichia Coli*: serum sensitivity and susceptibility to selected antimicrobials in milk. *Journal of Dairy Science* 79 (1),pp. 76-82.

FERA, MT., MAUGERI, TL., GIANNONE, M., GUGLIANDOLO, E., LA CAMERA, G., BLANDINO, M., & CARBONE, M. 2003: In vitro susceptibility of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* to different antimicrobial agents. *International Journal of antimicrobial agents.*, 21: 488-491.

FERNÁNDEZ-VARÓN, E., VILLAMAYOR, L., ESCUDERON, E., ESPUNY, A., & CÁRCELES, C.M., 2006a. Pharmacokinetics and milk penetration of moxifloxacin after intravenous and subcutaneous administration to lactating goats. *The Veterinary Journal* 172, 302-307.

FERNÁNDEZ-VARÓN, E., AYALA, I., MARÍN, P., CARRIÓN, A., MARTOS, N., ESCUDERO, E., & CÁRCELES, CM., 2006b. Pharmacokinetics of danofloxacin in horses after intravenous, intramuscular and intragastric administration. *Equine Veterinary Journal* 38 (4), 342-346.

FERNÁNDEZ-VARÓN, E., CÁRCELES, CM., MARÍN, P., MARTOS, N., ESCUDERO, E., & AYALA, I., 2006c. Pharmacokinetics of difloxacin after intravenous, intramuscular, and intragastric administration to horses. *American Journal of Veterinary Research* 66 (6): 1076-1081.

FERNÁNDEZ-VARÓN, E., MARÍN, P., ESCUDERON, E., VANCRAEYNEST, D., & CÁRCELES, C.M., 2007d. Pharmacokinetics-pharmacodynamic integration of danofloxacin after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration to rabbits. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 30, 18-24.

FERRÁNDIZ, M.J., FENOLL, A., LIÑARES J., & DE LA CAMPA A.G., 2000: Horizontal transfer of *parC* and *gyrA* in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44(4): 840-847

FINK, M.P., SNYDMAN, D.R., NIEDERMAN, M.S. Y COLS., 1994. Treatment of severe pneumonia in hospitalized patients: results of a multicenter, randomized, double-blind trial comparing intravenous ciprofloxacin with imipenem-cilastatin. *Antimicrob Agents Chemother*; 38: 547-57.

FIRSOV, A.A., VOSTROV, S.M., LUBENKO, I.Y., DRLICA, K., PORTNOY, Y.A., & ZINNER, S.H., 2003. In Vitro Pharmacodynamic Evaluation of the Mutant Selection Window Hypothesis Using Four Fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, No. 5. 1604-1613.

FISH, D.N., 2001. Fluoroquinolone adverse effects and drug interactions. *Pharmacotherapy*, 21(10 Pt 2): 253S-272S.

FORREST, A., NIX, D.E., BALLOW, C.H., GOSS, T.F., BIRMINGHAM, M.C., & SCHENTAG, J.J., 1993. Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37, 1073–1081.

FULZELE, S.V., SATTURWAR, P.M., & DORLE, A.K., 2007. Novel biopolymers as implant matrix for the delivery of ciprofloxacin: biocompatibility, degradation, and in vitro antibiotic release. *J Pharm Sci.*;96(1):132-44.

FURET, Y.X., & PECHERE, J.C., 1991. Newly documented antimicrobial activity of quinolones. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 10: 249-54.

GARCÍA-MONTIJANO, M., WAXMAN,S., DE LUCAS, J.J., SÁNCHEZ, C., QUETGLAS, J., DE SAN ANDRÉS, M.I., GONZALEZ, F., & RODRIGUEZ, C., 2001: The disposition of marbofloxacin in Eurassian buzzards (*buteo buteo*) after intravenous administration. *J. vet. Pharmacol. Therap.*, 24: 155-157.

GARCÍA-MONTIJANO, M., WAXMAN,S., DE LUCAS, J.J., LUACES, I., DE SAN ANDRÉS, M.D., & RODRIGUEZ, C., 2010: Disposition of marbofloxacin in vulture (*Gyps fulvus*) alter administration of a single dose. *Research in Veterinary Science*, 1-3

GARCIA OVANDO, H., GORLA, N., POLONI, G., TROTTI, N., PRIETO, G., & ERRECALDE. C., 2000 Intravenous pharmacokinetics of ciprofloxacin in goats *International Journal of Antimicrobial Agents*; 15:77–79

GARCÍA-RODRÍQUEZ, J.A. Y MUÑOZ-BELLIDO, J.L., 2003. ¿Qué nuevas quinolonas podemos esperar?. Symposium 3. Rev. Española de Quimioterapia. Vol. 16 (Sup. 1).

GARDNER, S. Y., DAVIS, J. L., JONES, S. L., LAFEVERS, D. H., HOSKINS, M. S., McARVER, E. M. & PAPICH, M.G., 2004: Moxifloxacin pharmacokinetics in horses and disposition into phagocytes after oral dosing. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics.*, 27(1): 57-60.

GARGALLO-VIOLA, D., ESTEVE, M., LLOVERA, S. & COLS., 1991. In Vitro and in vivo antibacterial activities of E-4497, a new 3-amine-3-methyl-azetidiny tricyclic fluorquinolone. *Antimicrob Agents Chemother*; 35: 442-7.

GAYNES, R., RIMLAND, D., KILLUM, E., LOWERY, H. K., JOHNSON II T. M., KILLGORE, G. & TENOVER, F. C., 2004: Outbreak of *Clostridium difficile* infection in a long-term care facility: association with gatifloxacin use. *Clin. Infect. Dis.*38(5):640–645.

GEHRING, R. & SMITH, G.W., 2006. An overview of factors affecting the disposition of intramammary preparation used to treat bovine mastitis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 29 (4),pp. 237-241.

GIBALDI, M. & PERRIER, P., 1982. *Pharmacokinetics* 2nd ed. Marcel Dekker. New York.

GOBERNADO, M. Y SANTOS, M., 1988. Fluorquinolonas: estructura, actividad in vitro, mecanismo de acción y resistencia. *Medicine.*, pág. 33-40.

GOBERNADO, M., ROMÁ, E. y PLANELLS, C., 1999: Quinolonas. Breve panorama de sus efectos adversos. *Rev. Esp. Quimioterap.*, 12(3):177-180.

GOBERNADO, M., 2001. Farmacocinética y farmacodinamia de las fluoroquinolonas. Relación con la actividad y la selección de mutantes resistentes. *Med. Clin.*, 2(2): 21-28.

GOBERNADO, M. Y SANTOS, M., 2002. Quinolonas En: *Tratamiento antimicrobiano*.3^o ed. Ed: Drobic L.Ergon. Madrid. Pág: 323- 348.

GONZÁLEZ, F., RODRÍGUEZ. C., J. J. DE LUCAS., WAXMAN, S., SAN ANDRÉS, M.D., SERRES, C., NIETO, J., & SAN ANDRÉS, M.I., 2007 Pharmacokinetics of a single intravenous dose of marbofloxacin in adult donkeys. *Veterinary Record*; 161:133-136

GOOTZ, T.D., BARRETT, J.F., & SUTCLIFFE, J.A., 1990. Inhibitory effects of quinolone antibacterial agents on eukaryotic topoisomerases and related test systems. *Antimicrob Agents Chemother*; 34: 8-12.

GOOTZ, T.D. & BRIGHTY, K.E., 1996. Fluorquinolone antibacterials: SAR mechanism of action, resistance and clinical aspects. *Medicinal Research Reviews* 16, 433-486.

GOOTZ, T.D., & BRIGHTY, K.E., 1998. Chemistry and mechanism of action of the quinolone antibacterials. In: Andriole, V.T. (Ed): *The quinolones*. Academic Press, San Diego, California, pp 29-80.

GOUDAH, A., ABD EL-ATY, A.M., REGMI, N.L., SHIN, H.C., SHIMODA, M., & SHIM, J.H., 2007: Single-dose pharmacokinetics of marbofloxacin in Egyptian buffalo (*Bubalus bubalis* L.) stress. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.*, 120(5-6): 215-220.

GOUDAH. A., & ABO-EL-SOUD.K, Pharmacokinetics, urinary excretion and milk penetration of levofloxacin in lactating goats. *2008 Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 32, 101–104,

GREENE, C.E., & BUDSBERG, SC, 1993. Veterinary use of quinolones. In: Hooper, D.C., Wolfson, J.S. (Eds.), *Quinolone Antimicrobial Agents*. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 473–488.

GROBBEL, M., LÜBKE-BECKER, A., WIELER, L.H., FROYMAN, R., FRIEDERICHS, S., & FILIOS, S., 2007. Comparative quantification of the in vitro activity of veterinary fluoroquinolones. *Vet Microbiol.* ;124(1-2):73-81.

GUINEA, J., GARGALLO-VIOLA, D., ROBERT, M. Y COLS., 1995. E-4695, a new C-7 azetidiny fluoronaphthyridine with enhanced activity against gram positive and anaerobic pathogens. *Antimicrob Agents Chemother*; 39: 413-21.

GUPTA, H., AQIL, M., KHAR, R.K., ALI, A., BHATNAGAR, A., & MITTAL, G., 2010a. Biodegradable levofloxacin nanoparticles for sustained ocular drug delivery. *J Drug Target*. 2010 Aug 3. [Epub ahead of print]

GUPTA, H., AQIL, M., KHAR, R.K., ALI, A., BHATNAGAR, A., & MITTAL, G., 2010b. Sparfloxacin-loaded PLGA nanoparticles for sustained ocular drug delivery. *Nanomedicine*.; 6(2):324-33.

GUTIÉRREZ-ZUFIAURRE, N., 2004: Relación entre estructura, actividad y efectos adversos de las quinolonas. *Rev. Esp. Quimioterap.*, 17(3): 232-243.

HARITOVA, A M., VELIZANOVA RUSENOVA, N., RUSENOV PARVANOV, P., DIMITROV LASHEV, L., & FINK-GREMMELS, J., 2006: Integration of pharmacokinetic and

pharmacodynamic indices of marbofloxacin in turkeys. *American Society for Microbiology.*, 50(11): 3779-3785.

HIASA, H., YOUSEF, D.O. & MARIANS, K.J., 1996: DNA strand cleavage is required for replication fork arrest by a frozen topoisomerase-quinolone-DNA ternary complex. *J. Biol. Chem.*, 271(42): 26424–26429.

HOOPER, D.C., 2000a: Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis.*, 31(Suppl 2): S24-28.

HOOPER, D.C., 2000b: New uses for new and old quinolones and the challenge of resistance. *Clin. Infect. Dis.*, 30: 243-254.

HOOPER, D.C., 2002: Fluoroquinolone resistance among gram-positive cocci. *Lancet infect. Dis.*, 2(9): 530-538.

HYOUNG-RYUN, P., TAE HEUNG, K., & KI-MIN, B., 2002. Physicochemical properties of quinolone antibiotics in various environments. *Eur. J. Med. Chem.* 27; 443-360.

IBRAHIM, H.K., EL-LEITHY, I.S., & MAKKY, A.A., 2010. Mucoadhesive nanoparticles as carrier systems for prolonged ocular delivery of gatifloxacin/prednisolone bitherapy. *Mol Pharm.*;7(2):576-85.

IHRKE, P.J., PAPICH, M.G., & DEMANUELLE, C., 1999. The use of fluoroquinolones in veterinary dermatology. *Veterinary Dermatology*, 10(3): 193-204.

ISMAIL. M., & EI-KATTAN. Y.A., 2007. Comparative pharmacokinetics of marbofloxacin in healthy and *Mannheimia haemolytica* infected calves. *Research in Veterinary Science*; 82:398–404

JACOBY G.A., CHOW, N. & WAITES, K.B., 2003: Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47(2): 559-562.

JAIN, D., CARVALHO, E., & BANERJEE, R., 2010. Biodegradable hybrid polymeric membranes for ocular drug delivery. *Acta Biomater.*;6(4):1370-9.

JENKINS, W., & FRIEDLANDER, L., 1988. The pharmacology of the quinolone antibacterial agents. In: *Quinolones; A new class of antimicrobials agents for use in veterinary medicine*. Proc West Vet Conf, Las Vegas, Nevada: Moby Corporation Animal Health Division, Shawnee, Kansas. 5-16.

JOIN-LAMBERT, O.F., MICHEA-HAMZEHPUR M., KOHLER, T., CHAU, F., FAURISSON, F., DAUTREY, S., VISSUZAINÉ, C., CARBON, C. & PECHERE, J., 2001: Differential selection of multidrug efflux mutants by trovafloxacin and ciprofloxacin in an experimental model of *Pseudomonas aeruginosa* acute pneumonia in rats. *Antimicrob. Agents Chemoter.*, 45(2): 571-576.

KARABLUT, N., & DRUSANO, G.L., 1993. Pharmacokinetics of the quinolone antimicrobial agents. In: Hooper, D.C., Wolfson, J.S. (Eds.), *Quinolone Antimicrobial Agents*. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 195–223.

KAWAKAMI, J., YAMAMOTO, K., ASANUMA, A., YANAGISAWA, K., SAWADA, Y. & IGA, T., 1997: Inhibitory effect of new quinolones on GABA(A) receptor-mediated response and its potentiation with felbinac in *Xenopus* oocytes injected with mouse-brain mRNA: correlation with convulsive potency in vivo. *Toxicol Appl Pharmacol.* 145(2): 246-54.

KING, D. E., MALONE, R.Y., & LILLEY, S.H., 2000. New classification and update on the quinolone antibiotics. *Am.Fam.Physician* 61:2741-2748.

KOVAR, A., DALLA, C.T., & DERENDORF, H., 1997. Comparison of plasma and free tissue levels of ceftriaxone in rats by microdialysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 86, 52–56.

KUKANICH, B., HUFF, D., RIVIERE, J.E., & PAPICH, M.G., 2007: Naïve average, naïve pooled, and population pharmacokinetics of orally administered marbofloxacin in juvenile harbour seals. *J Am Vet Med Assoc.*, 230(3): 390-395.

LAI, O.R., MARIN, P., LARICCHIUTA, P., MARZANO, G., CRESCENZO, G., & ESCUDERO, E., 2009: Pharmacokinetics of marbofloxacin in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) after single intravenous and intramuscular doses. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine.*, 40(3): 501-507.

LEES, P. & ALIABADI, F.S., 2002a. Rational dosing of antimicrobial drugs: animals versus humans. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 19: 269-284.

LEES, P. & ALIABADI, F.S., 2002b. Antimicrobianos que inhiben la función de los ácidos nucleicos. En: *Farmacología y terapéutica veterinaria*. Eds: Botana LM, Landoni F, Martín-Jiménez T. Mc Graw Hill Interamericana. Madrid. Pág: 484-488.

LEFEBVRE, HP., SCHNEIDER, M., DUPOUY, V., LAROUTE, V., COSTES, G., DELESALLE, L., & TOUTAIN, P, L., 1998. Effect of experimental renal impairment on disposition of marbofloxacin and its metabolites in the dog. *J. Vet. Pharmacol. Therapy.* 21(6): 453-461.

LEWBART, G., VANDEN, S., DEEN, J., MANAUGH, C., WHITT, D., DOI, A., SMITH, T. & FLAMMER, D., 1997: Pharmacokinetics of enrofloxacin in the red pacu (*Colossoma brachypomum*) after intramuscular, oral and bath administration. *J. vet. Pharmacol. Therap.*, 20: 124-128.

LI X-Z. & NIKAIIDO, H., 2004: Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs.* 64(2):159-204.

LIU Y, CUI J, & WANG R. 2005. Selection of rifampicin-resistant *Staphylococcus aureus* during tuberculosis therapy: concurrent bacterial eradication and acquisition of resistance. *J Antimicrob Chemother*; 56: 1172–1175.

LODE, H., BORNER, K., & KOEPPE, P., 1998. Pharmacodynamics of fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases* 27, 33–39.

LONGER, M.A. Y ROBINSON, J.R., 1987. Sistema de liberación sostenida de fármacos. En Remington Farmacia 17ªed. Panamericana. Buenos Aires. Pp 2240-2264.

LOWY, F D., 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *NEJM*; 339:520-32.

LUBASCH, A., KELLER, I., BORNER, K., KOEPPE, P. & LOFE, H., 2000. Comparative pharmacokinetics of ciprofloxacin, gatifloxacin, grepafloxacin, levofloxacin, trovafloxacin and moxifloxacin after single oral administration in healthy volunteers. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 44(10): 2600-2603.

LÜDERS, C., BARONI, E, E., RUBIO, S., DE LUCAS, J.J., DÍAZ, C.D. & SAN ANDRÉS M,I., 2012 Pharmacokinetic behavior and pharmacokinetic/pharmacodynamic indices of marbofloxacin after intravenous, subcutaneous, and intramuscular administrations in buffalo calves (<10 days old) . *J. Vet. Pharmacol. Therap* 35(3):301-304.

MADARAS-KELLY, K.J., LARSSON, A.J. & ROTSCHAFER, J.C., 1996: A pharmacodynamic evaluation of ciprofloxacin and ofloxacin against two strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemoter.*, 37(4):703-710.

MAHMOOD, I., 2001. Application of preclinical data to initiate the modified continual reassessment method for maximum tolerated dose-finding trials. *Journal of Clinical Pharmacology* 41, 19–24.

MAHMOOD, I., 2007. Application of allometric principles for the prediction of pharmacokinetics in human and veterinary drug development. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59 1177–1192

MANCEBO A., 2011. Estudio de formulaciones convencional y nuevas formulaciones deliberación retardada de danofloxacino enrofloxacino en la cabra. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.

MANDELL, L.A., BALL, P. & TILLOTSON, G., 2001. Antimicrobial safety and tolerability: differences and dilemmas. *Clin. Infect. Dis.*, 15;32 (1): S72-9.

MANN, D.D., & FRAME, G.M., 1992. Pharmacokinetic study of danofloxacin in cattle and swine. *American Journal of Veterinary Research* 53, 1022–1026.

MARÍN, P., LAY, O.R., LARICCHIUTA, G., MARZANO, G., DI BELLO, A., CÁRCELES, C.M., & CRESCENZO, G. 2009: Pharmacokinetics of marbofloxacin after a single oral dose to loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Research in Veterinary Science* , 87: 284-286.

MARÍN, P., ESCUDERO, E., FERNÁNDEZ-VARÓN, E., & CÁRCELES, CM., 2007a. Pharmacokinetics and milk penetration of orbifloxacin after intravenous, subcutaneous, and intramuscular administration to lactating goats. *American Dairy Science Association*, 90:4219-4225.

MARÍN, P., CÁRCELES, CM., ESCUDERO, E., & FERNÁNDEZ-VARÓN, E., 2007b. Pharmacokinetics and milk penetration of ibafloxacin after intravenous administration to lactating goats. *The Canadian Journal of Veterinary Research.*, 71: 74-76.

MARÍN, P., ESCUDERO, E., FERNÁNDEZ-VARÓN, E., & CÁRCELES, CM., 2007c. Pharmacokinetics and milk penetration of difloxacin after intravenous, subcutaneous and intramuscular administration to lactating goats. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 30: 74-79.

MARÍN, P., FERNÁNDEZ-VARÓN, E., ESCUDERO, E., & CÁRCELES, CM., 2007d. Pharmacokinetics after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration of difloxacin in sheep. *Research in Veterinary Science* 83, 234-238.

MARÍN, P., ESCUDERO, E., FERNÁNDEZ-VARÓN, E., RAMÍREZ, M.J., & CÁRCELES, C.M., 2010a. Pharmacokinetics and milk penetration of difloxacin after a long-acting formulation for subcutaneous administration to lactating goats. *J Dairy Sci.* 2010 Jul; 93(7):3056-64.

MARÍN P, ESCUDERO E, FERNÁNDEZ-VARÓN E, CÁRCELES CM, CORRALES JC, GÓMEZ-MARTÍN A, & MARTÍNEZ I., 2010b. Short communication: Fluoroquinolone

susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from caprine clinical mastitis in southeast Spain. *J Dairy Sci.* 2010 Jul; 93(10):5243-5245.

MARTINEZ, M., MCDEMOTT, P., & WALKER, R., 2006. Pharmacology of the fluorquinolones: a perspective for the use in domestic animals. *The Veterinary Journal* 172; 10-28.

MATSCHKE, C., ISELE, U., VAN HOOGEVEST, P., & FAHR, A., 2002. Sustained-release injectables formed in situ and their potential use for veterinary products. *Journal of Controlled Release*, 85: 1-15.

MERCK VETERINARY MANUAL, 1998. Quinolones. In: Aiello, S., Mays, A. (Eds), Title. Merck & Co., Whitehouse Station, NJ, pp. 1761-1765.

McCUSKER, M.E., HARRIS, A.D., PERENCEVICH, E. & ROGHMANN., M-C., 2003: Fluoroquinolone use and *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.*, 9(6): 730-733.

MCKELLAR, Q.A., 1996. Clinical relevance of the pharmacologic properties of fluorquinolones. *Suppl Compend Contin Educ Pract Veterinary*;18 (2): 14-21.

MCKELLAR, Q.A., SÁNCHEZ, S.F. & JONES, D.G., 2004: Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of antimicrobial drugs used in veterinary medicine. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 27(6):503-14.

MICHOT, J.M., SERAL, C., VAN BAMBEKE., F., MINGEOT-LECLERCQ, M.P. & TULKENS, P.M., 2005: Influence of efflux transporters on the accumulation and efflux of four quinolones (ciprofloxacin, levofloxacin, garenoxacin, and moxifloxacin) in J1774 macrophages. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49(6): 2429-2437.

MOUTON, J.W., DUDLEY, M.N., CARS, O., DERENDORF, H. & DRUSANO, G.L., 2005. Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs: an update. *J. Antimicrob. Chemother.*, 55 (5): 601-607.

MUAMMER ELMAS, BUNYAMIN TRAS, SEZAI KAYA, AHMET LEVENT BAS, ENVER YAZAR, ENDER YARSAN, 2001. Pharmacokinetics of enrofloxacin after intravenous and intramuscular administration in angora goats. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 65: 64-67.

MULLER, M., STAB, H., BRUNNER, M., MOLLER, J.G., LACKNER, E., & EICHLER, H.G., 1999. Penetration of moxifloxacin into peripheral compartments in humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43, 2345–2349.

NARASIMHAN, B. & PEPPAS, N.A., 1997. Molecular análisis of drug delivery systems controlled by dissolution of the polymer carrier. *J. Pharm. Sci.* 86 3: 297-304.

NAVARRE, C.B., & MARLEY, S., Antimicrobials Drug Use in Sheep and Goats. In "Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine" 32, 519-528. 2006 . Prescott JF, Baggot JD y Walker RD, Blackwell Scientific Publications. Iowa Fourth Edition.

NCCLS (WIKLER, M.A., COCKERILL, F.R., CRAIG, W.A., DUDLEY, M.N., ELIOPOULOS, F.M., HECHT, M.D., HINDLER, J.F., LOW, D.E., SHEEHAN, D.J., TENOVER, F.C., TURNIDGE, J.D., WEINSTEIN, M.P., ZIMMER, B.L., FERRARO, M.J. & SWENSON, J.M), 2006: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (Normas NCCLS sobre antibiograma), vol 26(3); Sixteenth informational supplement. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400. Wayne. PA. USA. ISBN: 1-56238-588-7.

NCCLS, 2002: Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals; approved standard. NCCLS document, M31-A2. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400. Wayne. PA. USA. ISBN: 1-56238-461-9.

NESSEEM, D.I., 2011. Ophthalmic delivery of sparfloxacin from in situ gel formulation for treatment of experimentally induced bacterial keratitis. *Drug Test Anal.*;3(2):106-15. doi: 10.1002/dta.170.

NIKAIDO, H. & THANASSI, D.G., 1993: Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluoroquinolones as examples. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37(7): 1393–1399.

ODENHOLT, I., LOWDIN, E., GUSTAFSSON, I. & CARS, O., 2002: Pharmacodynamics of moxifloxacin against *Streptococcus pyogenes* in an in vitro kinetic model. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46(6): 2046-8.

OKAZAKI, O., KOJIMA, C., HAKUSUI, H., & NAKASHIMA, M., 1991. Enantioselective disposition of ofloxacin in humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35, 2106–2109.

ORERO, A., CANTÓN, E., PEMÁN, J. & GOBERNADO, M., 2002: Penetración de los antibióticos en los polimorfonucleares humanos, con especial referencia a las quinolonas. *Rev. Esp. Quimioterap.* 15(2).

OTERO, J.L., MESTORINO, N., Y ERRECALDE, J.O., 2001a. Enrofloxacin: una fluorquinolona de uso exclusivo en veterinaria. Parte I: Química, mecanismo de acción, actividad antimicrobiana y resistencia bacteriana. *Analecta Veterinaria* 21, 1:31-41.

OTERO, J.L., MESTORINO, N., Y ERRECALDE, J.O., 2001b. Enrofloxacin: una fluorquinolona de uso exclusivo en veterinaria. Parte II: Farmacocinética y toxicidad. *Analecta Veterinaria* 21, 1:42-49.

PASTOR, A. Y CANTÓN, E., 1999: Interacciones de las bacterias y el antimicrobiano durante la fase de efecto postantibiótico. *Rev. Esp. Quimioterap.*,12(4).

PÉREZ-TRALLERO, E., FERNÁNDEZ-MAZARRASA, C., GARCÍA-REY, C., BOUZA, E., AGUILAR, L., GARCÍA-DE-LOMAS, J., BAQUERO, G. & THE SPANISH SURVEILLANCE GROUP FOR RESPIRATORY PATHOGENS, 2001: Antimicrobial susceptibilities of 1684 *Streptococcus pneumoniae* and 2039 *Streptococcus pyogenes* isolates and their ecological relationships: results of a 1-year (1998-1999) multicenter surveillance study in Spain *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45(12): 3334-3340.

PESTOVA, E., MILLICHAP, J.J., NOSKIN, G.A. & PETERSON, L.R., 2000: Intracellular targets of moxifloxacin: a comparison with other fluoroquinolones. *J.Antimicrob. Chemother.*, 45: 583-590.

PHILLIPS, I., KING, A., & SHANNON, K., 1998. In vitro properties of the quinolones. In: Andriole, V.T. (Ed): *The Quinolones*. Academic Press, San Diego, California, pp 81-116.

PIDDOCK, L.J., 1999. Mechanisms of fluoroquinolone resistance: An update 1994-1998. *Drugs*; 58 (Suppl. 2): 11-18.

PLA, J.M. Y OBACH, R., 1982. PERSPECTIVAS TERAPÉUTICAS CON SU FUNDAMENTO FARMACOLÓGICO. (dir: J. Esplugues). *Farmacología general*. Fundación García Muñoz. Valencia. 7: 19-54.

PLA, J.M. Y POZO, A. del, 1974: *MANUAL DE INICIACIÓN A LA BIOFARMACIA (Farmacocinética aplicada)*. Romagraf. Barcelona.

PLUMB, D.C., 2010: Marbofloxacin. En : *Manual de farmacología veterinaria*. Buenos aires, Argentina. Ed. Inter-Médica. Pag: 682-684.

POOLE, K., 2000: Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemoter*, 44 (9): 2233-2241.

PROOST JH., 1994. MULTIFIT & PkPdFIT Programs. Department of Pharmacology and Therapeutics. University Centre for Pharmacy. University of Groningen

QUINTILIANI, M.D., 2004: Using pharmacodynamic and pharmacokinetic concepts to optimize treatment of infectious diseases. *Infect. Med.*, 21(5): 219-233.

RAO, G.S., RAMESH, S., AHMAD, A.H., TRIPATHI, H.C., SHARMA, L.D., & MALIK, J.K., 2001. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intramuscular administration of enrofloxacin in goats. *Veterinary Research Communications*, 25: 197-204.

RAO, G.S., RAMESH, S., AHMAD, A.H., TRIPATHI, H.C., SHARMA, L.D., & MALIK, J.K., 2002a. Disposition kinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin following intravenous administration of enrofloxacin in goats. *Small Ruminant Research* 44: 9-15.

RAO, G.S., RAMESH, S., AHMAD, A.H., TRIPATHI, H.C., SHARMA, L.D., & MALIK, J.K., 2002b. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in goats given enrofloxacin alone and in combination with probenecid. *The veterinary Journal*, 163, 85-93.

REGLAMENTO (CE) N o 470/2009 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 6 de mayo de 2009 por el que se establecen procedimientos comunitarios para la fijación de los límites de residuos de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal, se deroga el Reglamento (CEE) n o 2377/90 del Consejo y se modifican la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) n o 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea* L 152/11. 16/06/2009.

RESUMEN CIENTÍFICO ICAAC, 2006: 46th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). San Francisco: American Society of Medicine. Ed.

RIEGELMAN S., & COLLIER P. 1980, The application of statistical moment theory to the evaluation of in vivo dissolution time and absorption time. *J Pharmacokinetic Biopharm.* Oct;8(5):509-34.

ROBICSEK, A., STRAHILEVITZ J, JACOBY G.A., MACIELAG M., ABBANAT D., PARK CH.P., BUSH K. & HOOPER D.C., 2006: Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase *Nat. Med.* 12(1): 83 – 88.

ROUGIER, S., GALLAND, D., BOUCHER, S., BOUSSARIE, D., & VALLÉ, M., 2006. Epidemiology and susceptibility of pathogenic bacteria responsible for upper respiratory tract infections in pet rabbits. *Vet Microbiol.*;115(1-3):192-8.

ROWLAND. M., & TOZER. T., 2011. *Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: Concepts and Applications*. 4th Edition. Lippincott Williams & Wilkins

RUBINSTEIN, E., 2001. History of quinolones and their side effects. *Chemoterapy*, 47 (Suppl3):3-8.

RUIZ J., 2003: Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J. Antimicrob. Chemother.*, 51: 1109-1117.

SANDERS C.C., 2001: Mechanisms responsible for cross-resistance and dichotomous resistance among the quinolones. *Clin. Infect. Dis.*, 32 (Suppl 1): S1-S8.

SCHAEFLER, S., 1989. Methicilin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* resistant to quinolones. *J Clin Microbiol.*; 27: 335-6.

SCHEDLETZKY, H., WIEDEMANN, B. & HEISIG, P., 1999. The effect of moxifloxacin on its target topoisomerases from *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 43: 31-37.

SCHNEIDER, M., VALLÉ, M., WOEHRÉ, F., & BOISRAMÉ, B., 2003: Pharmacokinetics of marbofloxacin in lactating cows after repeated intramuscular administration and pharmacodynamics against mastitis isolated strains. *J. Dairy Sci.*, 87: 202-211.

SCHENTAG, J.J., & SCULLY, B.E., 1999. Antimicrobial therapy and vaccines. In: Yu VL, Merigan TC Jr, Barriere SL, eds. *Quinolones*. Baltimore: Williams & Wilkins, 875-901.

SCHRICKX, J., & FINK-GREMMELS, J., 2008. Implications of ABC transporters on the disposition of typical veterinary medicinal products. *European Journal of Pharmacology* 585, 510–519.

SHEN, L.L., MITSCHER, L.A., SHARMA, P.N. Y COLS., 1989. Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: A cooperative drug-DNA binding model. *Biochemistry*; 28: 3886-3894).

SHEM-ToV, .M., ZIV. G., GLICKMAN. A., & SARAN. A., 1997. Pharmacokinetics and Penetration of Marbofloxacin from Blood into the Milk of Cows and Ewes. *Journal of Vet. Med.A*; 44:511-519

SHIMIZU, M., TAKASE, Y., NAKAMURA, S., KATAE, H., & MINAMI, A., 1975: Pipemidic acid, a new antibacterial agent active against *Pseudomonas aeruginosa*: in vitro properties. *Antimicrob. Agents. Chemoter.*, 8: 132-138.

SIDHU, P.K., LANDONI, M.F., & LEES, P., 2005: Influence of marbofloxacin on the pharmacokinetic and pharmacodynamic of tolfenamic acid and in calves. *J. vet. Pharmacol. Therap.*, 28: 109-119.

SIDHU. P.K., LANDONI. M.F., ALIABADI, F.S. & LEES, P., 2010 PK–PD integration and modeling of marbofloxacin in sheep *Research in Veterinary Science*; 88:134–141

SIEFERT, H.M., DOMDEY-BETTE, A., HENNINGER, K., HUCKE, F., KOHLSDORFER, C., & STASS, H.H., 1999. Pharmacokinetics of the 8-methoxyquinolone, moxifloxacin: a comparison in humans and other mammalian species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 43 (Suppl B), 69–76.

SPRENG, M., DELEFORGE, J., THOMAS, V., BOISRAMÉ, B., & DRUGEON, H., 1995. Antibacterial activity of marbofloxacin. A new fluoroquinolone for veterinary use against canine and feline isolates. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*; 18 :284-289.

STEIN, G.E., 2000. The methoxyfluoroquinolones: gatifloxacin and moxifloxacin *Infect. Med.*, 17(8): 564-570.

STOCKLEY, I.H. 2004. *Interacciones farmacológicas*. Pharma Editores S. L. Barcelona.

SUMANO, L.H., 1993. Quinolonas y fluorquinolonas en medicina veterinaria. *Veterinaria México*; 24 (2): 83-92.

SULTANA, Y., AQIL, M., ALI, A., & ZAFAR, S., 2006. Evaluation of carbopol-methyl cellulose based sustained-release ocular delivery system for pefloxacin mesylate using rabbit eye model. *Pharm Dev Technol.*;11(3):313-9.

SUN, Y., PENG, Y., AKSORNKOAE, N., JOHNSON, JR., GREGG BORING, J., SCRUGGS, D., COOPER, RC., LAIZURE, SC., & SHUKLA, AJ., 2002. Controlled release of oxytetracycline in sheep. *Journal of Control Release* 85 (1-3): 125-134.

TALAN, D.A., 2001: Clinical perspectives on new antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis.*, 15;32(1): S64-71.

TALÉNS-VISCONTI, R., GARRIGUES, T.M. & CANTÓN, E., 2002. Quinolonas y *Streptococcus pneumoniae*. Mecanismo de acción y resistencia. *Rev. Esp. Quimioterap.*, 15(4): 313-324.

TILLOTSON, G.S., 1996. Quinolones: structure-activity relationships and future predictions. *J Med Microbiol.*; 44: 320-4.

TITOS, J.C., 2010. Estudio de formulaciones convencional y nuevas formulaciones deliberación retardada de enrofloxacin en la cabra. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.

TOUTAIN, P.L. & BOUSQUET-MELOU, A., 2004a. Plasma terminal half-life. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 27: 427-439.

TOUTAIN, P.L. & BOUSQUET-MELOU, A., 2004b. Bioavailability and its assessment. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 27: 455-466.

TOUTAIN, P.L., DEL CASTILLO, J.R., & BOUSQUET-MELOU, A., 2002. The pharmacokinetic–pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics. *Research in Veterinary Science* 73, 105–114.

TOUTAIN, P.L. & LEES, P., 2004. Integration and modelling of pharmacokinetic and pharmacodynamic data to optimise dosage regimens in veterinary medicine. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 27: 467-477.

TRAN, J.H. & JACOBY, A., 2002: Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 5638-5642.

TURNIDGE, J., 1999. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones. *Drugs*, 58 (Suppl 2): 29-36.

USP Drug information, 2003: Fluoroquinolones veterinary-systemic. In *United States Pharmacopeia Veterinary Pharmaceutical Information Monographs-Antibiotics*. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 26(Suppl 2):87-108).

VACAS FERNÁNDEZ, C., 2003. Evolución del sector caprino en la Región de Murcia (1986-2000) y su caracterización productiva al final del milenio. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.

VANCUTSEM, P.M., BABISH, J.G., & SCHWARK, W.S., 1990. The fluoroquinolone antimicrobials: structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity. *Cornell Veterinarian*; 80: 173-186.

VOERMANS, M., VAN SOEST, J.M., VAN DUIJKEREN, E., & ENSINK, J.M., 2006: Clinical efficacy of intravenous administration of marbofloxacin in a *Staphylococcus aureus* infection in tissue cages in ponies. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 29: 555-560.

VON ROSENSTIEL, N., & ADAM, D., 1994. Quinolone antibacterials. An update of their pharmacology and therapeutic use. *Drugs*; 47: 872-901.

WALKER, R.D., 2000. The use of fluoroquinolones for companion animal antimicrobial therapy. *Australian Veterinary Journal* 78, 84–90.

WAMBERG, S., SANDGAARD, N.C.F., & BIE, P., 2002. Simultaneous determination of total body water and plasma volume in conscious dogs by the indicator dilution principle. *Journal of Nutrition* 132, 1711S–1713S.

WAXMAN, S., RODRIGUEZ, C., GONZALEZ, F., DE VICENTE, M.L., SAN ANDRES, M.I., & SAN ANDRES, M.D., 2001. Pharmacokinetic behaviour of marbofloxacin after intravenous and intramuscular administrations in adult goats. *Journal of Veterinary Pharmacological Therapy* 24, 375–378.

WAXMAN, S., SAN ANDRES, M. D., GONZALEZ, F., J. J. DE LUCAS., SAN ANDRES M.I., & RODRIGUEZ, C., 2003. Influence of *Escherichia coli* endotoxin-induced fever on the pharmacokinetic behavior of marbofloxacin after intravenous administration in goats. *Journal of Veterinary Pharmacological Therapy* 26, 65–69.

WAXMAN, S., SAN ANDRES, M. D., GONZALEZ, F., SAN ANDRES M.I., J. J. DE LUCAS., & RODRIGUEZ, C., 2004. Age-related changes in the pharmacokinetics of marbofloxacin after intravenous administration in goats. *Journal of Veterinary Pharmacological Therapy* 27, 31–35.

WAXMAN, S., SAN ANDRES, M. D., GONZALEZ, F., SAN ANDRES M.I., J. J. DE LUCAS., & RODRIGUEZ, C., 2007. Pharmacokinetic behavior and pharmacokinetic/pharmacodynamic integration of marbofloxacin after subcutaneous administration in goats. *The Veterinary Journal* 174 (2007) 425–427

WAKNIS V, JONNALAGADDA S., 2011. Novel poly-DL-lactide-polycaprolactone copolymer based flexible drug delivery system for sustained release of ciprofloxacin. *Drug Deliv.* 18(4):236-45.

WETZSTEIN, H.G., & DE JONG, A., 1996. In Vitro bactericidal activity and postantibiotic effect of fluorquinolones used in veterinary medicine. *Suppl Compend Contin Educ Pract Vet.*; 18 (2): 22-29.

WETZSTEIN, H.G., SCHEMEER, N. & KART. W., 1997: Degradation of the fluoroquinolone enrofloxacin by the brown rot fungus *Gloeophyllum striatum*: identification of metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4272-81.

WISE, R., 1999: A review of the clinical pharmacology of moxifloxacin, a new 8-methoxyquinolone, and its potential relation to therapeutic efficacy *Clin. Drug Invest.*, 17(5): 365-388.

XIE, S., ZHU, L., DONG, Z., WANG, X., WANG, Y., LI, X., & ZHOU, W., 2011. Preparation, characterization and pharmacokinetics of enrofloxacin-loaded solid lipid nanoparticles: influences of fatty acids. *Colloids Surf B Biointerfaces.*; 83(2):382-7.

XUAN, D., ZHONG, M., MATTOES, H., BUI, K.Q. McNABB, J., NICOLAU, D.P. QUINTILIANI, R. & NIGHTINGALE, C.H., 2001. Streptococcus pneumoniae response to repeated moxifloxacin or levofloxacin exposure in a rabbit tissue cage model. *Antimicrob. Agents Chemoter.*, 45(3): 794-799.

YAMAOKA, K., NAKAGAWA, T. & UNO, T., 1978a. Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *J. Pharm. Biopharm.*, 6: 165-175.

YAMAOKA, K., NAKAGAWA, T. & UNO, T., 1978b. Statistical moments in pharmacokinetics. *J. Pharm. Biopharm.*, 6: 547-558.

YAMAOKA, K., TAMIGAWARA, Y., & UNO, J., 1981. A pharmacokinetic analysis program (MULTI) for microcomputers. *J. Pharmacobio-Dyn.*, 4: 879-885.

YIN, L.F., HUANG, S.J., JIANG, S.G., ZHAO, C.J., PEI, Z.Q., ZHANG, Q., 2011. In vitro and in vivo evaluation of levofloxacin sustained-release capsules. *Drug Dev Ind Pharm.*;37(1):33-40.

ZHANEL, G.G., 2001. Influence of Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Principles on Antibiotic Selection. *Current Infectious Disease Report* 3, 29–34.

ZHANG, L., PARSONS, DL., NAVARRE, C., & KOMPELLA, UB., 2002. Development and in-vitro evaluation of sustained release Poloxamer 407 (P407) gel formulations of ceftiofur. *Journal of Control Release* 85 (1-3): 73-81.

ABREVIATURAS

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS:

- AIC**: Criterio de información de AKAIKE.
- C.V.**: Coeficiente de variación.
 - n**: número de datos analizados.
- N.S.**: Nivel de significación.
- P**: Probabilidad.
- R²**: Coeficiente de correlación.
- RSD**: Desviación estándar de medidas repetidas.
- S.D.**: Desviación estándar.

PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS

- AUC**: Área bajo la curva, calculada según métodos no compartimentales.
- Cl**: Aclaramiento plasmático calculado en función del área bajo la curva.
 - C_{máx}**: Concentración periférica máxima (administración intravenosa), concentración plasmática máxima (administración intramuscular).
- F**: Biodisponibilidad.
- k_a**: Constante aparente de absorción.
- k₁₀**: Constante de eliminación.
- k₁₂**: Constante de transferencia al compartimento periférico.
- k₂₁**: Constante de retorno desde el compartimento periférico.
- λ₁**: Constante híbrida de disposición rápida.
- λ₂**: Constante híbrida de disposición lenta.
- MAT**: Tiempo medio de absorción.
- MRT**: Tiempo medio de residencia.
 - t_{máx}**: Tiempo en el que se alcanza la concentración periférica máxima (administración intravenosa), tiempo en el que se alcanza la concentración plasmática máxima (administración intramuscular y subcutánea).
- t_{1/2}**: Tiempo de vida media o vida media del fármaco.
- t_{1/2ka}**: Tiempo de vida media aparente de absorción.

- $t_{1/2\alpha,1}$: Tiempo de vida media de la fase de disposición rápida.
- $t_{1/2\lambda,z}$: Tiempo de vida media de la fase disposición lenta.
- V_c : Volumen de distribución aparente en el compartimento central.
- V_p : Volumen de distribución aparente en el compartimento periférico.
- V_{ss} : Volumen de distribución aparente en estado estacionario.
- V_z : Volumen de distribución aparente en función del área bajo la curva.
- W_i : es el factor de ponderación.

-**Vmax**: velocidad máxima de absorción de un fármaco obtenida mediante técnicas de deconvolución

OTRAS:

-**MIC**: Concentración Mínima Inhibitoria. Concentración menor de antibacteriano capaz de inhibir el crecimiento de 10^5 bacterias en 1 ml de medio de cultivo, tras 18-24 horas de incubación.

-**MPC**: Concentración preventiva de mutantes: concentración mínima de antibacteriano capaz de inhibir el crecimiento de las cepas menos susceptibles cuando se inocula una elevada cantidad de bacterias ($\geq 10^9$ CFU/mL).

-**MPI**: índice de prevención de mutantes, relación entre la concentración preventiva de mutantes y la concentración mínima inhibitoria

-**VSM**: ventana de selección de mutantes: rango de concentraciones plasmáticas de fármaco con un límite inferior correspondiente a la concentración mínima inhibitoria, y uno superior correspondiente a la concentración preventiva de mutantes.

-**EPA**: Efecto postantibiótico.

-**g**: Constante gravitatoria (980 cm/s^2).

-**HPLC**: Cromatografía líquida de alta resolución.

-**FL**: Fluorescencia

-**IM**: Intramuscular.

-**IV**: Intravenosa.

-**LOQ**: Límite de cuantificación.

-**LOD**: Límite de detección.

-NAC: Neumonía adquirida en comunidad o extrahospitalaria.

-PK-PD: Farmacocinética-Farmacodinámica.

-p.o.: por vía oral.

-SC: Subcutánea.

-SNC: Sistema Nervioso Central.

-spp.: especies.

