



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO DE FORMULACIONES POLIMÉRICAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE DANOFLOXACINO EN OVINO

2014

Memoria presentada por
María Amparo Moregó Soler,
para optar al grado de Doctora
Internacional en Farmacia

El presente trabajo para acceder al grado de Doctor Internacional se ha realizado dentro del proyecto titulado:

Optimización del uso de fluoroquinolonas en pequeños rumiantes mediante nuevas formulaciones de liberación controlada parenterales.

Entidad financiadora:

Subdirección General de Proyectos de Investigación del Ministerio de Ciencia e Innovación.

Proyecto: AGL2008-004/GAN

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mis padres, Lola y Pepe. Sin duda, ellos me han dado todo lo que tengo y todo lo que soy. A ellos les debo el valor del esfuerzo y la constancia, los pilares que me han formado como persona.

Gracias por vuestro apoyo y cariño, por vuestro esfuerzo porque no me faltara nada. Nunca acabaré de agradeceros todo lo que habéis hecho y hacéis por mí. Os quiero.

A mi hermano que ha estado siempre a mi lado queriéndome y apoyándome, por darme lo mejor de él. No se puede tener un hermano mejor.

A mi abuela y mi tía por ser una segunda madre para mí, por dárme todo, y no fallar ni una noche con tus dulces palabras. No habrá nunca una abuela mejor que TÚ.

También a mis tíos Carlos y Conchín, por su ánimo y apoyo incondicional y a mis abuelos, que ya no están con nosotros pero que siguen conmigo.

Y como no, a Denis, mi otra mitad. Por estar a mi lado aun en la distancia y darme su ternura y paciencia.

“No hay distancia que no se pueda recorrer ni meta que no se pueda alcanzar”

Napoleón Bonaparte.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que directa o indirectamente han participado en la realización de este trabajo y que han facilitado que después de todo lo pasado haya llegado a buen término.

Todo esto no hubiese sido posible sin la participación y mediación de mis directores de Tesis. A ellos les quiero expresar un agradecimiento especial:

- Al Dr. Alberto Espuny Miró, por su extraordinaria guía, paciencia y motivación. Pero sobre todo, quiero agradecerle su calidez como persona, ser tutor, adjunto y amigo y estar a mi lado durante todo este tiempo. Gracias por su ilusión y apoyo incondicional, además de su amistad.
- Al Dr. Carlos Cárcelos Rodríguez por sus buenos consejos, orientación y confianza. Un guía excepcional en mi paso por el departamento y un ejemplo de seriedad y profesionalidad.

Al Dr. Emilio Fernández-Varón, otro pilar fundamental en el equipo. Gracias por su dedicación y ayuda, así como por la confianza depositada en mí y en este trabajo.

A la Dra. Elisa Escudero Pastor y Dr. Pedro Marín Carrillo, por el inestimable apoyo prestado y su abierta disponibilidad para cualquier cosa.

A Vero, por la ayuda prestada desde el primer momento en el laboratorio y sus conocimientos, que han permitido que desarrollara la parte experimental. Gracias por su paciencia, calidez y compañerismo.

Al Director de la Granja y a su equipo de trabajo, entre ellos Miguel Angel Fernández González, veterinario de la explotación, por poner a nuestra disposición los animales empleados en el presente trabajo.

Especial agradecimiento también a Rafael Baselga y Gema Chacón de EXOPOL por habernos proporcionado las cepas de campo utilizadas en el presente trabajo.

A los residentes de farmacia del Hospital General Universitario Morales Meseguer, por su ayuda y apoyo, por escucharme cuando lo necesitaba, por su amistad y cariño. Agradecerles las risas y los buenos ratos que hemos pasado, los consejos y las palabras de ánimo. Gracias por los recuerdos que quedan guardados con mucho cariño.

A todos GRACIAS de corazón.

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
2.1.- Introducción histórica	7
2.2.- Estructura química y clasificación	9
2.2.1.- Estructura química	9
2.2.2.- Clasificación	10
2.3.- Mecanismo de acción	16
2.4.- Relación estructura y actividad	20
2.5.- Propiedades físicas y químicas	26
2.6.- Espectro antibacteriano	29
2.6.1.- Actividad frente a cocos Gram positivos	31
2.6.2.- Actividad frente a Gram negativos	32
2.6.3.- Actividad frente a Gram negativos no fermentadores	35
2.6.4.- Actividad frente a anaerobios	34
2.6.5.- Actividad frente a patógenos atípicos	34
2.7.- Efecto postantibiótico de quinolonas	36
2.8.- Resistencias bacterianas	39
2.8.1.- Alteraciones en las dianas	39
2.8.2.- Alteraciones en la permeabilidad bacteriana	41
2.8.3.- Resistencia por los sistemas de eflujo	42
2.8.4.- Otros mecanismos de resistencia	43
2.9.- Prevención de resistencias	44
2.10.- Integración farmacocinética-farmacodinámica	45
2.11.- Utilización clínica de las fluorquinolonas	48

2.12.- Toxicidad y efectos adversos	53
2.12.1.- Relación entre estructura y efectos adversos	58
2.13.- Interacciones	60
2.13.1.- Interacciones con medicamentos	60
2.13.2.-Interacciones con alimentos	61
2.13.3.-Interacciones a nivel de la absorción	62
2.13.4.- Interacciones a nivel del metabolismo	62
2.13.5.- Interacciones a nivel de la excreción	63
2.13.6.-Otras interacciones	63
2.14.-Propiedades farmacocinéticas	64
2.14.1.- Absorción y biodisponibilidad	65
2.14.2.- Distribución	66
2.14.3.- Metabolismo y excreción	68
2.14.4.- Diferencias interespecíficas	69
2.14.5.- Difusión de las quinolonas a la leche	71
2.15.- Danofloxacino	72
2.15.1.- Estructura química y relación estructura-actividad	72
2.15.2.- Propiedades físicas y químicas	73
2.15.3.- Espectro antibacteriano	73
2.15.4.- Actividad de danofloxacino en diferentes especies animales	75
2.15.5.- Indicaciones clínicas	78
2.15.5.1.- Indicaciones aprobadas por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios. Ficha técnica	78
2.15.5.2.- Indicaciones aprobadas por la Food and Drug Administration (FDA)	79

2.15.6.- Posología, forma de administración y duración del tratamiento	79
2.15.7.- Precauciones y tiempos de espera	80
2.15.8.- Contraindicaciones	81
2.15.9.- Toxicidad y efectos adversos	81
2.15.10.- Interacciones con medicamentos	82
2.15.11.- Propiedades farmacocinéticas	82
2.15.11.1.- Absorción y biodisponibilidad	82
2.15.11.2.- Distribución	85
2.15.11.3.- Metabolismo y excreción	88
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	90
3.1.- Material	91
3.1.1.- Material fungible	91
3.1.2.- Productos y reactivos	91
3.1.3.- Aparataje	92
3.1.4.- Software informático	93
3.2.- Animales	93
3.3.- Protocolo experimental	94
3.4.- Técnicas analíticas	97
3.5.- Validación de la técnica	97
3.5.1.- Linealidad	97
3.5.2.- Recuperación	98
3.5.3.- Precisión	98
3.6.- Análisis farmacocinético	99
3.6.1.- Análisis compartimental de datosplasmáticos	99

3.6.2.- Análisis no compartimental de datos plasmáticos	100
3.6.3.- Análisis de datos en leche	100
3.7.- Métodos estadísticos	101
3.8.- Cálculo de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI)	102
4.- RESULTADOS	103
4.1.- Administración intravenosa de danofloxacino	104
4.2.- Administración subcutánea de danofloxacino	109
4.3.- Administración subcutánea de danofloxacino en solución del polímero P407 al 25%	116
4.4.- Administración subcutánea de danofloxacino en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2%	122
4.5.- Comparación de los parámetros farmacocinéticos de danofloxacino tras su administración intravenosa, subcutánea, subcutánea en solución del polímero P407 al 25% y subcutánea en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2%	128
4.6.- Excreción en leche de danofloxacino tras su administración intravenosa	134
4.7.- Excreción en leche de danofloxacino tras su administración subcutánea	140
4.8.- Excreción en leche de danofloxacino tras su administración subcutánea con solución del polímero P407 al 25%	147
4.9.- Excreción en leche de danofloxacino tras su administración subcutánea en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2%	153
4.10.- Comparación de los parámetros farmacocinéticos de danofloxacino 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% más carboximetilcelulosa al 2%	161

4.11.- Parámetros farmacodinámicos (CMI) obtenidos frente a cepas de <i>Staphylococcus Aureus</i>	165
5.- DISCUSIÓN	168
5.1.- Administración intravenosa de danofloxacino en ovejas	169
5.1.1.- Modelo farmacocinético	169
5.1.2.- Parámetros farmacocinéticos	171
5.1.2.1.- Constantes híbridas de disposición rápida y lenta	171
5.1.2.2.- Microconstantes	172
5.1.2.3.- Tiempos de vida media y tiempo medio de residencia	174
5.1.2.4.- Volúmenes de distribución aparente	175
5.1.2.5.- Área bajo la curva	177
5.1.2.6.- Aclaramiento plasmático	177
5.2.- Administración subcutánea de danofloxacino en ovejas	178
5.2.1.- Modelo farmacocinético	178
5.2.2.- Parámetros farmacocinéticos	179
5.2.2.1.- Tiempos de vida media, MRT y MAT	179
5.2.2.2.- Tiempo máximo y concentración máxima	179
5.2.2.3.- Constante de absorción y semivida de absorción	182
5.2.2.4.- Área bajo la curva y biodisponibilidad	183
5.3.- Administración subcutánea de danofloxacino en solución del polímero P407 al 25% en ovejas	184
5.3.1.- Modelo farmacocinético	184
5.3.2.- Parámetros farmacocinéticos	185
5.3.2.1.- Tiempos de vida media, MRT y MAT	185
5.3.2.2.- Tiempo máximo y concentración máxima	187

5.3.2.3.- Constante de absorción y semivida de absorción	188
5.3.2.4.- Área bajo la curva y biodisponibilidad	188
5.4.- Administración subcutánea de enrofloxacin en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% en ovejas	189
5.4.1.- Modelo farmacocinético	189
5.4.2.- Parámetros farmacocinéticos	190
5.4.2.1.- Tiempos de vida media, MRT y MAT	190
5.4.2.2.- Tiempo máximo y concentración máxima	192
5.4.2.3.- Constante de absorción y semivida de absorción	193
5.4.2.4.- Área bajo la curva y biodisponibilidad	193
5.5.- Comparación entre administraciones	194
5.5.1.- Tiempo de vida media ($t_{1/2\lambda_z}$)	195
5.5.2.- Tiempo medio de residencia (MRT)	196
5.5.3.- Constante de absorción (k_a)	197
5.5.4.- Tiempo máximo ($T_{m\acute{a}x}$) y concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$)	198
5.5.5.- Tiempo medio de absorción (MAT)	200
5.5.6.- Área bajo la curva (AUC)	201
5.5.7.- Biodisponibilidad (F)	203
5.6.- Estudio farmacocinético de la excreción en leche de danofloxacin	204
5.6.1.- Evolución de las concentraciones de danofloxacin en leche: administración intravenosa	204
5.6.1.1.- Tiempo medio de residencia (MRT)	205
5.6.1.2.- Tiempo máximo ($T_{m\acute{a}x}$) y concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$)	205
5.6.1.3.- Área bajo la curva (AUC) y ratio AUC_{leche}/AUC_{plasma}	207

5.6.1.4.- Cantidad total de danofloxacino excretada en leche	207
5.6.2.- Evolución de las concentraciones de danofloxacino en leche: administración subcutánea	208
5.6.2.1.- Tiempo medio de residencia (MRT)	208
5.6.2.2.- Tiempo máximo ($T_{m\acute{a}x}$) y concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$)	208
5.6.2.3.- Área bajo la curva (AUC) y ratio AUC_{leche}/AUC_{plasma}	209
5.6.2.4.- Ratio $C_{m\acute{a}x-leche}/C_{m\acute{a}x-plasma}$	210
5.6.2.5.- Cantidad total de danofloxacino eliminada en leche	211
5.6.3.- Evolución de las concentraciones de danofloxacino en leche: administración subcutánea en solución del polímero P407 al 25%	211
5.6.3.1.- Tiempo medio de residencia (MRT)	212
5.6.3.2.- Tiempo máximo ($T_{m\acute{a}x}$) y concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$)	213
5.6.3.3.- Área bajo la curva (AUC) y ratio AUC_{leche}/AUC_{plasma}	213
5.6.3.4.- Ratio $C_{m\acute{a}x-leche}/C_{m\acute{a}x-plasma}$	214
5.6.3.5.- Cantidad total de danofloxacino eliminada en leche	215
5.6.4.- Evolución de las concentraciones de danofloxacino en leche: administración subcutánea en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2%	215
5.6.4.1.- Tiempo medio de residencia (MRT)	216
5.6.4.2.- Tiempo máximo ($T_{m\acute{a}x}$) y concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$)	216
5.6.4.3.- Área bajo la curva (AUC) y ratio AUC_{leche}/AUC_{plasma}	217
5.6.4.4.- Ratio $C_{m\acute{a}x-leche}/C_{m\acute{a}x-plasma}$	218
5.6.4.5.- Cantidad total de danofloxacino eliminada en leche	218
5.7.- Comparación de las concentraciones en leche entre administración intravenosa, subcutánea y subcutánea de danofloxacino en: solución del polímero P407 al 25% y en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2%	219

5.7.1.- Tiempo medio de residencia (MRT)	219
5.7.2.- Tiempo máximo ($T_{m\acute{a}x}$) y concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$)	220
5.7.3.- Área bajo la curva (AUC)	221
5.7.4.- Ratio AUC_{leche}/AUC_{plasma} , ratio $C_{m\acute{a}x-leche}/C_{m\acute{a}x-plasma}$	222
5.8.- Integración farmacocinética/farmacodinámia	223
6.- CONCLUSIONES	227
7.- CONCLUSIONS	233
8.- RESUMEN	238
9.- SUMMARY	245
10.- BIBLIOGRAFÍA	252
11.- ABREVIATURAS	287

1.- INTRODUCCIÓN

El objetivo de la farmacocinética consiste en estudiar la evolución temporal de las concentraciones, 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.

El comportamiento farmacocinético de un determinado fármaco varía en las diversas especies animales, incluso muy cercanas filogenéticamente (Escudero y cols., 1999), debido a diferencias morfológicas y fisiológicas: aparato digestivo, funcionalidad hepática, funcionalidad renal, ritmo cardíaco, etc. Ello obliga a evitar las extrapolaciones de posologías de una especie a otra, en la medida de lo posible. Por ello es importante estudiar el comportamiento farmacocinético de cada fármaco en las especies en las que se pretende aplicar.

En las especies animales de producción de alimentos, los antibióticos y antiparasitarios son, sin duda, medicamentos usados 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 antibióticos 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. 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 vida medio prolongado, permitiendo regímenes de administración de 1-2 veces al día (Walker, 2000; Schentag, 1999).

A las dosis apropiadas, las fluoroquinolonas son bactericidas, presentando un patrón concentración dependiente y un prolongado efecto post-antibiótico (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 han ido surgiendo nuevas fluoroquinolonas con una aumentada actividad frente a Gram positivos y anaerobios, y retienen la actividad frente a gram negativos, propia de las quinolonas precedentes (Aminimanizani y cols., 2001).

Danofloxacino es una fluoroquinolona desarrollada exclusivamente para ser usada en medicina veterinaria. Tiene una rápida actividad bactericida contra un amplio rango de patógenos responsables de enfermedades de gran relevancia clínica y económica (Escudero y cols., 2007).

En lo que a animales de producción se refiere, cuando se administran fármacos a una gran manada o explotación, 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.

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).

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 carboximetilcelulosa y la hidroxipropil-metilcelulosa. De ellas, la carboximetilcelulosa resulta ser, frecuentemente, bien tolerada (Zhang y cols., 2002), la cual ha sido elegida para este estudio.

Son varias quinolonas las que han sido estudiadas en formulaciones de liberación controlada: 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).

Es por esto, al considerar todo lo expuesto hasta el momento, y dada la importancia de la oveja en sector lechero y cárnico, nos hemos planteado en la siguiente memoria estudiar la farmacocinética de danofloxacino en esta especie con el fin de alcanzar los objetivos que se presentan en el siguiente apartado.

Objetivos

1. Determinación de los parámetros farmacocinéticos de danofloxacino tras la administración intravenosa y subcutánea, en solución acuosa, en ovejas.
2. Determinación de los parámetros farmacocinéticos danofloxacino tras su administración subcutánea, en solución del polímero P407 al 25% y en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2%, en ovejas.
3. La determinación, y cuantificación, de la eliminación de danofloxacino 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 danofloxacino frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, aisladas de ovejas procedentes de granjas comerciales, como germen representativo de procesos infecciosos mamarios en la especie a estudiar.
5. Establecimiento de los parámetros farmacocinéticos-farmacodinámicos de danofloxacino 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.- INTRODUCCION HISTÓRICA

Las quinolonas, también conocidas como 4-quinolonas, comprenden un gran grupo de agentes antimicrobianos sintéticos muy heterogéneo de quimioterápicos de síntesis y usados desde hace más de 40 años (Dámaso, 1990).

El hallazgo fortuito de la actividad antibacteriana de derivados de la 1,8-naftiridina (Tillotson, 1996) mientras se desarrollaban agentes antimaláricos, permitió la síntesis del ácido nalidíxico (1-etilo-1,4 dihidro-7-metilo-4-oxo-1,8 naftiridina-3-ácido carboxílico) en el año 1962 (Lescher y cols.). Esta molécula presentaba baja penetración intracelular, reducido espectro antibacteriano y baja absorción oral. Con bajas concentraciones en plasma, alta concentración mínima inhibitoria (MIC 4-16 mg/dL) (Gootz, y cols., 1996) y un perfil farmacocinético que solo producía una adecuada concentración en vías urinarias. Por todo esto, su uso se reservó para el tratamiento de infecciones urinarias no complicadas. (Mella, 2000).

Sobre la estructura del ácido nalidíxico, se fueron introduciendo numerosas modificaciones buscando nuevos antimicrobianos con mayor espectro. Así fueron sintetizadas las primeras 4-quinolonas, con estructuras similares: ácido pipemídico (piridopirimidina), el ácido oxolínico, la flumequina y el cinoxacino (cinolona). Estas moléculas fueron usadas también en infecciones urinarias por Gram negativos (Read, y cols., 2000).

El gran descubrimiento correspondió a la síntesis de compuestos que presentaban los sustituyentes 6- fluoro y 7- piperazinil. Esta nueva síntesis dió lugar a un aumento de la absorción oral, un aumento de la distribución a tejidos así como de su actividad antimicrobiana, presentando actividad frente organismos como *Pseudomonas aeruginosa* y cocos Gram positivos (Ball, 2000). Es entonces, cuando aparecen las fluoroquinolonas, derivadas de naftiridinas o de quinolinas.

En 1976 se desarrolla el primer compuesto con un flúor en posición 6; la flumequina. Hasta entonces ninguno de los compuestos anteriores presentaba mejoras frente al ácido nalidíxico. Flumequina dió indicios de tener actividad frente a Gram positivos (Appelbaum y Hunter, 2000). Es activa frente *Enterobacterias*, incluyendo algunas cepas que eran resistentes al ácido nalidíxico, además tiene actividad contra la gonorrea no complicada (Emmerson y Jones, 2003).

Posteriormente, en 1978 se sintetizó el norfloxacino, con un flúor en posición 6 y una cadena lateral de piperazina en posición 7. Al poco tiempo de su descubrimiento se patentaron

y comercializaron varias fluoroquinolonas: pefloxacino (1979), enoxacino (1980), fleroxacino (1981), ciprofloxacino (1981) y ofloxacino (1982). Sus espectros de actividad incluyen tanto a especies Gram positivas como Gram negativas, su absorción en el tracto gastrointestinal es buena y sus niveles en sangre son adecuados para poder ser usadas en infecciones sistémicas. Sin embargo, pese a las modificaciones introducidas, algunas especies, concretamente *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, mostraron resistencia a este grupo de quimioterápicos (Appelbaum y Hunter, 2000; Emmerson y Jones, 2003).

La primera fluoroquinolona aprobada para su uso en la práctica clínica fue norfloxacino en la última parte de la década de los años 80, seguido de ciprofloxacino (Martínez y cols., 2006). En el campo de la veterinaria, la primera fluoroquinolona aprobada para su uso fue enrofloxacino (Baytril®, Mobay) a finales de 1980.

En los últimos años, 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 *Staphylococcus 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.

Los siguientes compuestos comercializados fueron dirigidos hacia la consecución de estos objetivos. Así, se encuentra a sparfloxacino, levofloxacino y grepafloxacino, que mejoraron el perfil farmacocinético y la actividad frente a anaerobios y Gram positivos (particularmente el neumococo), si bien y aunque posean mayor actividad frente a estafilococos que ciprofloxacino y ofloxacino, ésta aún no resulta la ideal (Appelbaum y Hunter, 2000; Lubasch y cols., 2000).

En veterinaria, debido a su alta potencia, amplio espectro, actividad bactericida dependiente de la concentración, óptimas características farmacocinéticas y baja toxicidad, las

fluoroquinolonas se utilizan ampliamente para tratar infecciones en caninos, felinos, equinos, bovinos, porcinos y aves. 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 porcino, bovino y aves (Ihrke y cols., 1999; Lees y Aliabadi, 2002b). Entre las moléculas más utilizadas y exclusivas del ámbito veterinario podemos mencionar: amifloxacino, enrofloxacino, difloxacino, danofloxacino, marbofloxacino, sarafloxacino, orbifloxacino e ibafloxacino (Brown, 1996; Martínez y cols., 2006).

2.2.- ESTRUCTURA QUIMICA Y CLASIFICACIÓN

2.2.1.- ESTRUCTURA QUIMICA

Las quinolonas están formadas por un anillo heteroaromático bicíclico que combina el núcleo β piridona, ácido carboxílico y un anillo aromático (naftiridina, quinolina, cinolina o piridopirimidina) (figura 1):

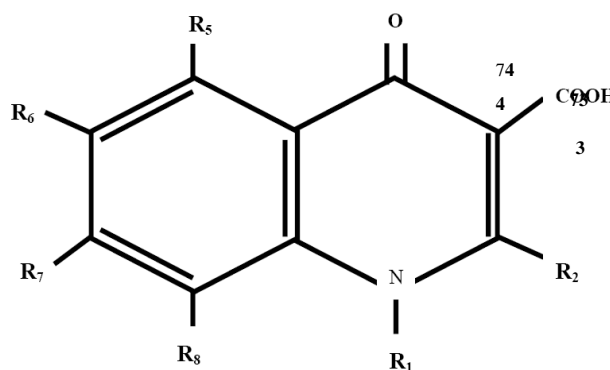


Figura 1.- Estructura básica o núcleo de las quinolonas.

Por ser agentes obtenidos sintéticamente, se ha podido obtener un notable conocimiento sobre la relación entre la estructura básica de las 4-quinolonas, sus sustituyentes y las propiedades microbiológicas, farmacocinéticas y tóxicas que determinan (Bryskier, 1995).

Desde un punto de vista de su estructura química, todas las quinolonas se clasifican en cuatro grupos: 4-oxo-naftiridinas o 4-naftiridonas, 4-oxoquinolinas o 4 quinolonas, 4-oxocinolininas o 4-cinolonas, y 4-oxopiridopirimidinas o 4-primidonas. Posteriormente se desarrollaron las 2-piridonas, bioisómeros de las quinolonas, en las cuales el nitrógeno de la posición 1 sustituye el carbono entre la posiciones C4 y C5 (Gutiérrez-Zufiaurre, 2004) (figura 2).

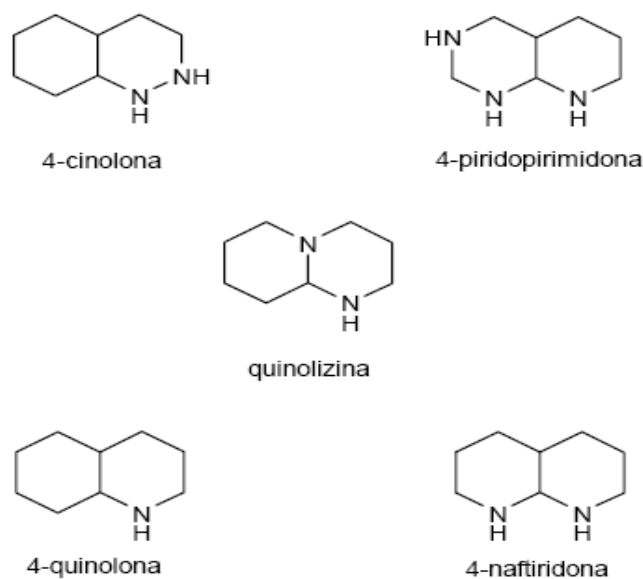


Figura 2.- Clasificación de las quinolonas según su estructura química.

De estas estructuras, tan solo las 4-quinolonas y las 4-naftiridonas se han desarrollado, ya que la presencia de un nitrógeno en posición 2 (4-cinolonas) o en posición 6 (4-pirimidonas) dan lugar a una reducción notable de la actividad (Gutiérrez-Zufiaurre, 2004). Sobre el anillo base se han ido probando modificaciones con el fin de variar la actividad frente a microorganismos, modificar las propiedades farmacocinéticas y perfil toxicológico. De esta forma y por su fácil síntesis se han desarrollado una gran cantidad de compuestos, aunque muchos de ellos no se han seguido investigando por problemas de toxicidad o porque no aportan ventajas frente a moléculas ya sintetizadas (Gutiérrez-Zufiaurre, 2004).

2.2.2.- CLASIFICACIÓN

Existen diferentes formas de clasificación de las quinolonas, el más sencillo de ellos es agruparlas por la fecha de licencia para su uso clínico, otros como los que se detallarán a continuación se basan en la estructura química, aunque quizá el más utilizado se basa en su actividad y farmacocinética. Actualmente se ha comenzado a utilizar una nomenclatura similar a la empleada con las cefalosporinas, de manera que existe un cierto consenso en describir a las quinolonas en generaciones (Mella, 2000).

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, tioxacino.

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): grepafloxacino, gatifloxacino.

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

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

IV.- CUARTA GENERACIÓN (derivados de la quinoleína)

1.- Monofluoroquinolonas: clinafloxacino, moxifloxacino.

I- Así, las quinolonas de *primera generación* (Figura 3) serían las moléculas históricamente más antiguas y que definen los núcleos químicos básicos de estos antimicrobianos. Estructuralmente se caracterizan por la ausencia de un radical 6-fluoro, con excepción de flumequina, y por no exhibir una asociación de 6-fluoro con el grupo piperazina en posición C7 (presente en ácido pipemídico) (Mella y cols., 2000). Con bajo espectro antimicrobiano y útiles sólo en infecciones leves 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).

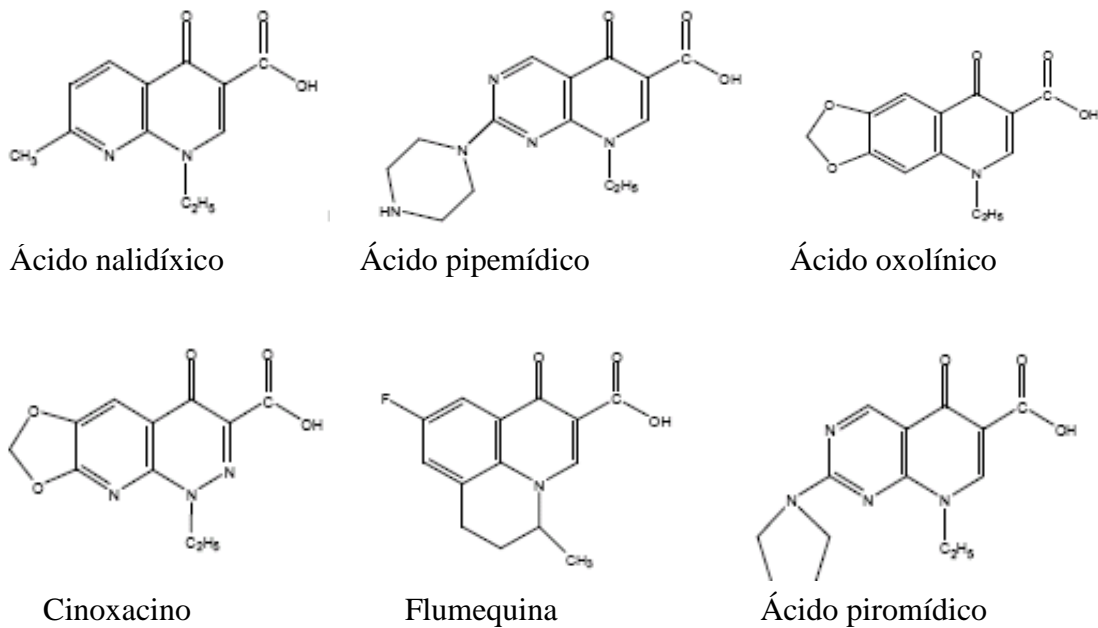


Figura 3.- Principales quinolonas de primera generación.

II- Las quinolonas de *segunda generación* (Figura 4) se caracterizan fundamentalmente por la presencia ya constante del flúor en la posición 6 y un grupo piperazina o metil piperazina en la posición 7 del antibacteriano. La molécula estándar de esta generación es el norfloxacino. Otros miembros de esta generación son el ciprofloxacino y enoxacino o rufloxacino. Por su actividad biológica, estas moléculas se utilizan en infecciones graves, incluidos cuadros osteoarticulares, digestivos, infecciones respiratorias, en partes blandas y de transmisión sexual (Von Rosenstiel y Adam, 1994). Son activas frente a *Pseudomonas aeruginosa*, algunas bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y determinadas especies de micobacterias, clamidias y riquetsias. Su actividad frente a *Acinetobacter* y *Stenotrophomonas maltophilia* es moderada y escasa frente a *Streptococcus pneumoniae* y otras especies de *Streptococcus* (Gootz y Brighty, 1998; Furet y Pechere, 1991, King y cols., 2002.). Sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SAMR) rápidamente se describieron resistencias (Schaefer, 1989).

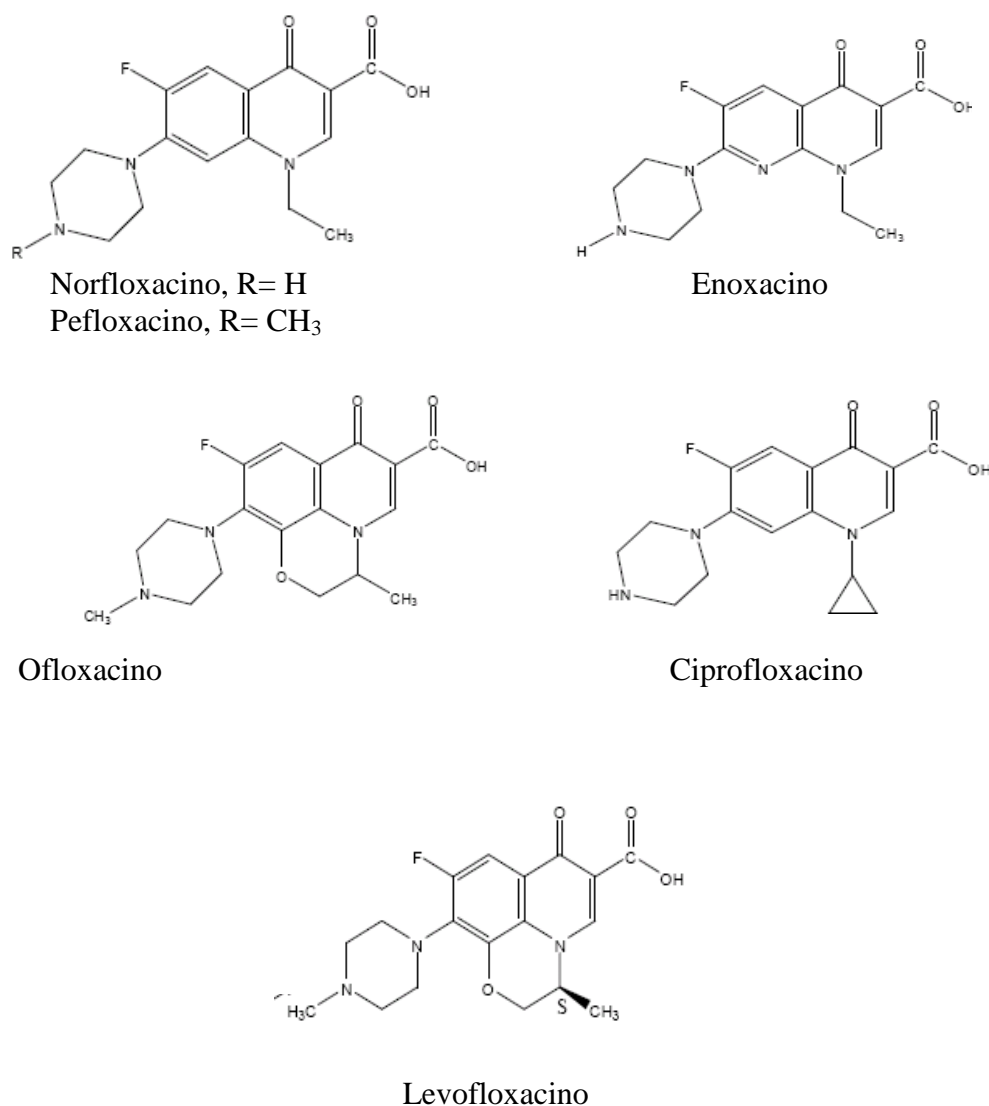


Figura 4.- Principales quinolonas de segunda generación.

III- Las quinolonas de *tercera generación* (Figura 5) se caracterizan químicamente por la presencia de grupos cíclicos aminados en C7, siendo frecuentes la presencia de aminopirrolidinas y grupos azabiciclo, 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* meticilin resistentes (Lowy, 1998). También presentan una actividad levemente superior a las quinolonas de 2ª generación frente a anaerobios (Guinea y cols., 1995; Gootz y Brighty, 1998;).

Algunas de ellas fueron retiradas del mercado después de aprobada su comercialización o se ha restringido su uso por sus efectos tóxicos (sparfloxacino, grepafloxacino) (Tálens-Visconti y cols., 2002).

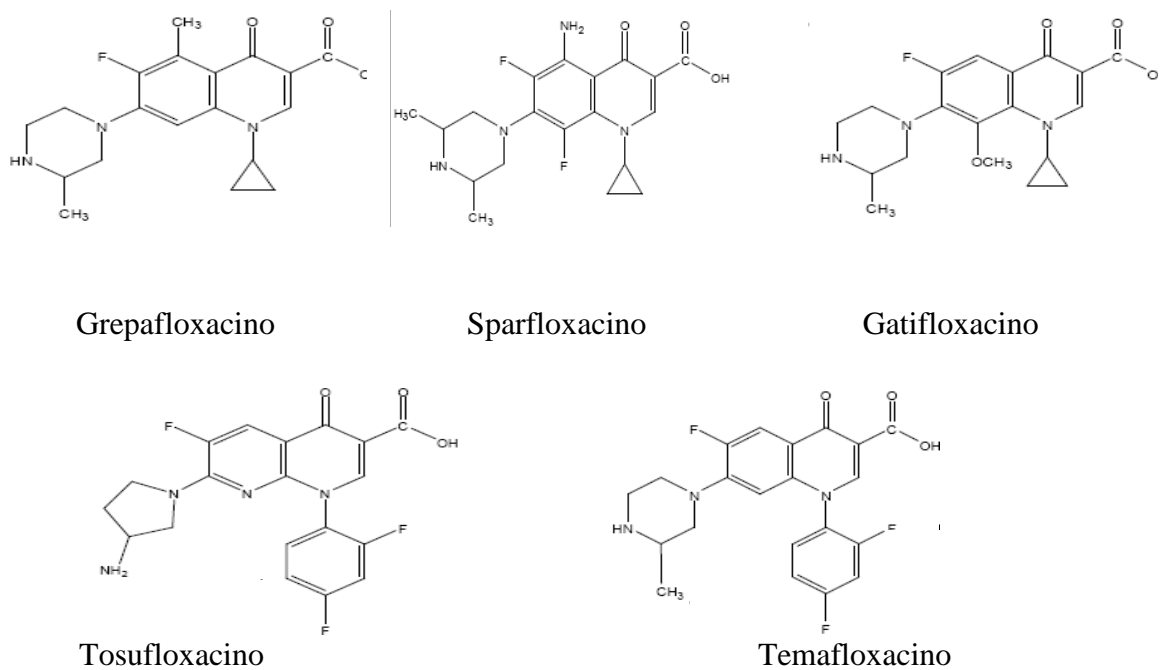
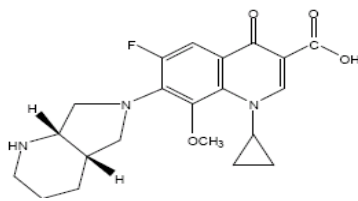


Figura 5.- Principales quinolonas de tercera generación.

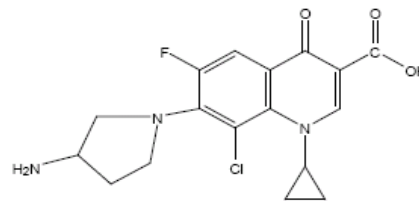
IV- Por último, las quinolonas de cuarta generación (Figura 6). Estas moléculas presentan mayor actividad frente a anaerobios, utilizándose en infecciones polimicrobianas como las abdominales y ginecológicas (Gargallo-Viola y cols., 1991; Gootz y Brighty, 1998; Philips y cols., 1998; King y cols., 2000).

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

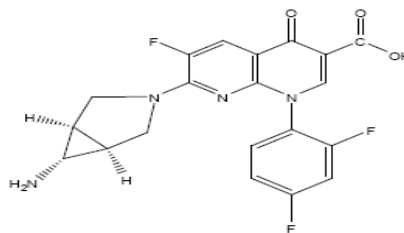
Estas quinolonas siguen siendo objeto de debate y motivo de investigación, tanto en lo referente a su aplicación clínica en el tratamiento de enfermedades infecciosas, como porque actúan sobre dianas de procariontes y eucariotas.



Moxifloxacin



Clinafloxacin



Trovafloxacin

Figura 6.- Principales quinolonas de cuarta generación.

Se han desarrollado nuevas estructuras como las 6-desfluoroquinolonas, sin átomo de flúor en posición 6, el cual 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.- MECANISMO DE ACCIÓN

En el año 1977 se demostró, en la bacteria *Escherichia coli*, la acción inhibitoria específica de la DNA-girasa del ácido nalidíxico, siendo esta su diana primaria y funcional. Posteriormente se descubrieron más especies bacterianas que poseían como diana la DNA-girasa (Yoshida y cols., 1993). Además, inhiben las actividades de la topoisomerasa IV (Wolfson y Hooper, 1989). Por ello, la DNA-girasa y la topoisomerasa IV son las dianas de las quinolonas (Drlica y Zhao, 1997).

Las quinolonas penetran en el interior de la bacteria (citoplasma bacteriano) mediante un mecanismo de difusión pasiva a través de porinas (canales acuosos de la membrana externa) o de la capa de lipopolisacáridos (Nikaido y Thanassi, 1993). Todas las fluoroquinolonas se acumulan dentro de la bacteria muy rápidamente (Piddock, 1994). Ésta acumulación es antagonizada por cationes como el magnesio y calcio, quizás por la unión a la superficie, mediante la quelación de cationes divalentes.

Una vez en el interior de la bacteria, las quinolonas se fijan a sus principales dianas, la DNA-girasa y la topoisomerasa IV, enzimas que pertenecen al grupo de las topoisomerasas (Tálens-Visconti y cols., 2002).

El mecanismo de acción de las quinolonas consiste en la formación de un complejo Quinolona-Enzima-DNA, provocando cambios conformacionales de la enzima que acaban bloqueando su acción normal, lo que inhibe la síntesis de DNA y acaba por provocar la muerte celular a través de la producción de exonucleasas y lisis celular (Shen y cols., 1989; Dámaso, 1990; Chen y cols., 1996; Gobernado y Santos, 2002; Blondeau, 2004).

Los efectos de las fluoroquinolonas sobre la proliferación bacteriana sugieren tres mecanismos de muerte celular (Maxwell y Critchlow, 1998; Guthrie y cols., 2004).

1. Mecanismo A: común a todas las fluoroquinolonas. Este requiere RNA y síntesis de proteínas y es solamente efectivo con bacterias en división. Este mecanismo bloquea la replicación mediante la formación del complejo girasa-quinolona sobre el DNA.
2. Mecanismo B: no requiere RNA ni proteínas de síntesis y puede actuar sobre bacterias que no están multiplicándose. Provoca una dislocación de las subunidades de la girasa y formación de un complejo ternario.
3. Mecanismo C: requiere RNA y proteínas de síntesis, pero no que las bacterias estén dividiéndose. Atrapa la topoisomerasa IV sobre el DNA.

El tipo de mecanismo de acción puede depender del microorganismo en cuestión. El ciprofloxacino, por ejemplo, muestra los mecanismos A y B contra *Escherichia coli*, pero solamente el A frente a *Staphylococcus aureus* (Brighty y Gootz, 1997).

En cuanto a los mecanismos de acción de las quinolonas podemos resaltar lo siguiente:

- Los primeros estudios señalaron que las quinolonas (ácido nalidíxico) eran incapaces de unirse al DNA, y no fue hasta 1985 cuando Shen propuso que el norfloxacino se unía al DNA y no directamente a la DNA-girasa y que su grado de unión dependía de la topología del DNA. El modelo propuesto por él, se denominó “unión cooperativa quinolona DNA”, que propone una inhibición de la DNA-girasa de modo indirecto (Shen y cols., 1989). El principio se sustenta en la generación de un lugar de unión de la quinolona al DNA relajado de cadena sencilla (ssDNA), producto de la rotura del DNA por acción de la enzima. Este corte produciría un desapareamiento de 4 pares de bases, lugar óptimo para la unión de las moléculas de quinolonas a las bases del DNA a través de puentes de hidrógeno, y dichas moléculas se unirían cooperativamente entre sí por un proceso de autoensamblaje.
- Estudios sobre la estructura cristalina del ácido nalidíxico proponen dos posibles tipos de interacción entre las moléculas de quinolonas. Por un lado, posibles interacciones hidrofóbicas cola con cola entre grupos laterales de N-1 y apilamientos entre los anillos de quinolonas. Estas interacciones dan lugar a un complejo supramolecular que formaría una unidad consolidada y saturaría el espacio abierto en la molécula de DNA por la DNA-girasa, cancelando así los eventos posteriores del proceso del superenrollamiento catalizados por esta enzima. Este modelo, donde la diana primaria es el DNA, parte de los supuestos siguientes: a) la topología del lugar de unión generado por la DNA-girasa, y b) la capacidad de las moléculas de quinolonas de autoensamblarse y ocupar tales lugares. En esta propuesta se establecen diferentes dominios funcionales en la molécula de quinolona: una región de unión al DNA a través de puentes de hidrógeno, una región lipofílica que permitiría la autoasociación de las moléculas de quinolonas y otra región de interacción con la DNA-girasa, sugiriéndose que los sustituyentes en el C-7 de la molécula de quinolona podría interaccionar con GyrB, la unidad estructural de la DNA-girasa (Shen y cols., 1989). . Esta enzima es un

complejo tetramérico, A_2B_2 , formado por dos monómeros A (GyrA) y dos monómeros B (GyrB) codificados por los genes *gyrA* y *gyrB*, y las proteínas GyrA son las dianas de las 4-quinolonas.

Este concepto de unión quinolona-DNA ha sido ampliado, como fruto de diferentes observaciones sobre la posible modulación del proceso de unión, proponiéndose que las quinolonas no se unen al DNA a través de puentes de hidrógeno, sino a través de Mg^{2+} , entre sus mitades carbonil y carboxil y los grupos fosfato del DNA, y que no hay autoasociación entre moléculas de quinolonas. Además, las bases de la región de ssDNA interactúan con el sistema planar del anillo de la molécula de quinolona, lo cual estabilizaría el complejo formado. También se ha sugerido que los sustituyentes en el C-7 y en el N-1 podrían estar implicados en la unión de la quinolona a la DNA-girasa.

- Los dos modelos comentados anteriormente parten de la premisa de que el DNA es la diana primaria de unión de las quinolonas, no obstante no existe un acuerdo general. Maxwell ha propuesto un modelo alternativo (Maxwell, 1997), en el cual la DNA-girasa es la diana primaria de las quinolonas, postulando que se requiere tanto la DNA-girasa como DNA para que las quinolonas interactúen de forma estable, sustentándose en que la mayoría de mutantes resistentes presentan cambios en la denominada “Región Determinante de Resistencia a Quinolonas” (QRDR) del gen *gyrA*, lo cual provoca una drástica reducción de la unión de la quinolona (norfloxacino) al complejo DNA-girasa DNA. Además, sugieren que los grupos carboxil del C-3 y oxo del C-4 de las quinolonas se unen por puentes de hidrógeno a las QRDR de la enzima. No obstante otros autores no descartan la participación de ciertos residuos de dicha región como el residuo Asp87 (Palumbo y cols., 1993; Vila y cols., 1994; Tálens-Visconti y cols., 2002).
- Otro modelo es el propuesto por Yoshida y cols. (1993), “quinolone pocket model”, el cual sostiene que las quinolonas interactúan en la hendidura formada por el complejo DNA-girasa DNA durante el corte y unión del DNA. La unión estaría determinada conjuntamente por las subunidades *gyrA* y *gyrB* y muy posiblemente también por los iones Mg^{2+} . Este modelo está más acorde con las hipótesis de unión quinolona DNA-girasa, que con los modelos de unión quinolona DNA.

Las topoisomerasas se dividen en dos clases (Tálens-Visconti y cols., 2002):

- Tipo I: actúan sobre una hélice del DNA. Pertenecen a este tipo las topoisomerasas I y III.
- Tipo II: actúan en ambas hélices del DNA. DNA-girasa y la topoisomerasa IV forman parte de este tipo. Son esenciales para el crecimiento bacteriano.

Las topoisomerasas I, II y IV están implicadas en la eficacia de la replicación y transcripción del DNA.

Otras topoisomerasas como la topoisomerasa V y la girasa reversa (topoisomerasas de tipo I) y la topoisomerasa VI (de tipo II) han sido descritas en arqueobacterias termófilas. Las topoisomerasas tipo I y las descritas en arqueobacterias no son diana para las quinolonas (Bouthier y cols., 1991; Nichols y cols., 1999).

Como se ha dicho antes, la DNA-girasa requiere ambas subunidades (GyrA, GyrB) y consumo de ATP para tener plena actividad. Los monómeros A intervienen en el corte y unión en determinados puntos del DNA, y los monómeros B inducen los superenrollamientos en torno al núcleo de RNA, se unen al ATP y participan en la transducción de la energía (Gellert y cols., 1976).

Parece que las quinolonas inhiben la acción de la DNA-girasa en la subunidad A impidiendo el cierre de los cortes producidos en el DNA, por lo que se inhibe su replicación (Tálens-Visconti y cols., 2002).

La DNA-girasa es la única enzima capaz de introducir un superenrollamiento negativo en la cadena de DNA (Hooper, 2000), facilitando la separación de la doble hélice de DNA para mantener la estructura de la horquilla de replicación (Drlica, 1999).

El complejo entre la enzima y el DNA consiste en aproximadamente 130 pares de bases localizadas en el núcleo de la proteína. La unión se realiza mediante enlaces covalentes entre la tirosina (Tyr 122) de la subunidad A con 4 bases libres que se generan después de crear una rotura en el DNA. Posteriormente, y mediante la hidrólisis de ATP (subunidad B), la DNA-girasa introduce un enrollamiento negativo en el DNA, relajando la estructura producida por la horquilla de replicación y volviendo a unir las dos cadenas de DNA (Maxwell, 1997; Heddle y cols., 2000; Schmitz y cols., 2002)

La topoisomerasa IV es una proteína hetero-tetramérica formada por la unión de dos subunidades C y dos subunidades E, codificadas en este caso en los genes *parC* y *parE* respectivamente. Esta topoisomerasa fue descrita en 1990 (Kato y cols., 1990).

Principalmente, la topoisomerasa IV es responsable del desencadenamiento de las dos moléculas “hijas” al finalizarse la replicación del DNA, permitiendo la segregación de los dos

nuevos cromosomas bacterianos en dos nuevas células “hijas” (Drlica, 1999). También es responsable, como todas las topoisomerasas, de la relajación del DNA (Hooper, 1998; Zechiedrich y cols., 1997).

Los aminoácidos codificados por los genes parC y parE son homólogos a los codificados por gyrA y gyrB, respectivamente (Kato y cols., 1990). Esta similitud implica que las quinolonas puedan inhibir la actividad tanto de la DNA-girasa como de la topoisomerasa IV (Yoshida y cols., 1990).

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 *Streptococcus 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 (Tálens-Visconti y cols., 2002).

Las fluoroquinolonas, como las penicilinas, exhiben un efecto paradójico. Las curvas de supervivencia muestran que cuando la concentración de fluoroquinolonas está cerca de la concentración mínima inhibitoria (CMI ó MIC) de la bacteria, el fármaco detiene el crecimiento bacteriano (efecto bacteriostático). Sin embargo cuando se incrementa la concentración de las quinolonas en relación a las CMIs bacterianas, aumenta la muerte celular hasta una cierta concentración de fármaco (concentración bactericida óptima). Un incremento por encima de esta concentración óptima puede conducir a un descenso del efecto bactericida. Esta relación entre el efecto de las quinolonas y su concentración se debe a las diferencias entre la concentración necesaria para inhibir el superenrollamiento y la concentración necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano. En general, parece que la reacción de superenrollamiento de la girasa es menos sensible a las quinolonas que el crecimiento bacteriano (Maxwell y Critchlow, 1998; Guthrie y cols., 2004).

2.4.- RELACIÓN ESTRUCTURA Y ACTIVIDAD

Las distintas modificaciones estructurales en las quinolonas modifican a las mismas en cuanto a: actividad antimicrobiana, farmacocinética, toxicidad e interacciones con otros fármacos (Gutiérrez-Zufiaurre, 2004).

Las sustituciones en la estructura básica de las quinolonas pueden ser:

- Constantes: aquellas que definen al grupo.
- Habituales: aquellas en las que las opciones de cambio son escasas (posiciones X2 y X6) y en ambas suele haber un nitrógeno o un carbono unido a un átomo o un radical muy pequeño.
- Variables: las posibilidades de cambio son mayores (R1, R5, R7 y X8), siendo la posición R7 la que mayor número de posibilidades de cambio posee.

▪ Sustituciones en posiciones 1.

Los radicales ubicados en esta posición son variables pero esenciales en la actividad antimicrobiana y en las características farmacocinéticas. Van a ser los responsables de una de las uniones de la molécula de quinolona con la topoisomerasa (Chu y Fernandes, 1989; Peterson, 2001; Gutiérrez-Zufiaurre, 2004).

En esta posición encontramos básicamente tres radicales distintos:

- Grupo etilo: ácido nalidíxico, pipemídico, norfloxacin, pefloxacin, enoxacin y lomefloxacin. En el caso de fleroxacin, este grupo etilo está fluorado (Gutiérrez-Zufiaurre, 2004).
- Posteriormente, se añadieron grupos más voluminosos que mejoraron la actividad frente a patógenos tanto Gram negativos como Gram positivos. Se añadió entonces un grupo ciclopropilo, mejorando la actividad frente a Gram negativos (Appelbaum y cols., 2005). Este radical lo presentan: ciprofloxacino, sparfloxacin, grepafloxacin, clinafloxacino, moxifloxacino, gatifloxacino y gemifloxacino. Sitafloxacino, además, tiene un flúor unido al ciclopropilo. Este radical está considerado como el que confiere mayor actividad a la molécula (Peterson, 2001).
- Radical 2,4-difluorofenilo: aumenta la actividad frente a Gram positivos, sobre todo frente a *Streptococcus pneumoniae* (Chu y Fernandes, 1989; Peterson, 2001; Gutiérrez-Zufiaurre, 2004). Lo podemos encontrar en temafloxacino y tosufloxacino (Appelbaum y Hunter, 2000).

La presencia de un ciclopropilo o mejor de un radical terc-butilo asociado con un metoxi en posición C8, aumenta la actividad frente a las micobacterias (Renau y cols., 1996).

Otros radicales en esta posición parecen dar lugar a un descenso de la actividad de la molécula, probablemente por un menor número de enlaces entre la molécula y el enzima (Gutiérrez-Zufiaurre, 2004).

▪ **Sustituciones en posiciones 2.**

Sobre esta posición se han realizado pocos cambios. Aún así, el radical que se sitúe en esta posición ha de ser pequeño puesto que está íntimamente ligado al lugar de unión a las topoisomerasas (R3 y R4). La presencia de un radical voluminoso no permitiría la unión de la molécula al ADN (Stein, 1988; Domagala, 1994; Gutiérrez-Zufiaurre, 2004).

Se han realizado diferentes sustituciones (Chu y fernández, 1989; Domagala, 1994; Gutiérrez-Zufiaurre, 2004).

- Un carbono unido a un hidrógeno (C-H): presente en casi la totalidad de las quinolonas.
- Sustitución por un nitrógeno: lo podemos encontrar en cinoxacino (4-cinolona). Hace a la molécula menos activa, de ahí que se haya desarrollado poco.
- Sustitución por un átomo de azufre: no desarrollados.

▪ **Sustituciones en posiciones 3 y 4.**

En estas dos posiciones encontramos un grupo carboxilo y un grupo ceto, respectivamente. Estos dos grupos son esenciales para la actividad antibacteriana de la molécula, puesto que son esenciales para el transporte al interior de la bacteria y para la unión de las topoisomerasas.

Si el radical en posición 3 se sustituye, la molécula ve reducida notablemente su actividad salvo en los casos *in vivo* que este radical se vuelve a convertir en carboxilo (Chu y Fernández, 1989, Higgins y cols., 2003).

En estas posiciones las quinolonas se unen al calcio, magnesio, hierro etc., lo que determina una disminución de su absorción (Domagala, 1994; Gutiérrez-Zufiaurre, 2004).

▪ **Sustituciones en posiciones 5.**

Esta posición parece influir alterando la configuración estérica de la molécula, afectando a la actividad, así como a su espectro de acción, concretamente modificaciones en este radical se ha visto que incrementan la actividad de la molécula frente a bacterias Gram

positivas, aunque está fuertemente influenciado por sustituciones presentes en el resto de la molécula (Appelbaum y Hunter, 2000).

Un grupo metilo en esta posición aumenta la actividad frente a bacterias Gram positivas y no frente a Gram negativas (Yoshida y cols., 1996).

La mayoría de las quinolonas presentan un hidrogeno en esta posición (Appelbaum y Hunter, 2000). La presencia de un grupo amino (sparfloxacino), o un grupo hidroxilo o metilo (grefapfloxacino) incrementan la actividad frente a Gram positivos (Andersson y Macgowan, 2003; Gutiérrez-Zufiaurre, 2004), y también frente a *Toxoplasma gondii* (Yoshida y cols., 1996).

Algunas presentan otros grupos más voluminosos como grupo metoxi o átomo de halógeno, sustituciones que disminuyen la actividad intrínseca de la molécula, posiblemente por interacciones con las posiciones 3 y 4 (Appelbaum y Hunter, 2000; Gutiérrez-Zufiaurre, 2004).

▪ **Sustituciones en posiciones 6.**

Puede existir un nitrógeno (no admite sustitución), o un carbono (permite la introducción de otro radical que debe ser pequeño). La adición de un grupo flúor al carbono en esta posición mejoró la actividad intrínseca de la molécula de 5 a 100 veces comparado con las anteriores moléculas que no poseían esta sustitución dando lugar al grupo de las fluoroquinolonas (Gutiérrez-Zufiaurre, 2004).

La presencia de un hidrógeno en posición 6 en lugar de flúor, dio lugar a un grupo nuevo de quinolonas llamadas 6-desfluoroquinolonas (Ledoussal y cols., 1999). Su principal representante es el garenoxacino (BMS-284756). Estas nuevas quinolonas mantienen o mejoran poco su actividad frente a bacterias Gram negativas y patógenos atípicos, y aumentan mucho su actividad frente a patógenos Gram positivos (Jones y cols., 2002; Roychoudhury y Ledoussal, 2002). Otras quinolonas no fluoradas son PGE 9262932, PGE 9509924 y PGE 4175997 (Barry y cols., 2001). En la Figura 7 se representan algunos ejemplos.

Unos nuevos sustituyentes en esta posición son los 6-amino, 8-metilquinolonas, que aumentan la actividad frente a Gram positivos. Una sustitución en C7 de una tetrahidroisoquinolina aumenta de cuatro a cien veces la actividad de ciprofloxacino (Cecchetti y cols., 1996; Gutiérrez-Zufiaurre, 2004).

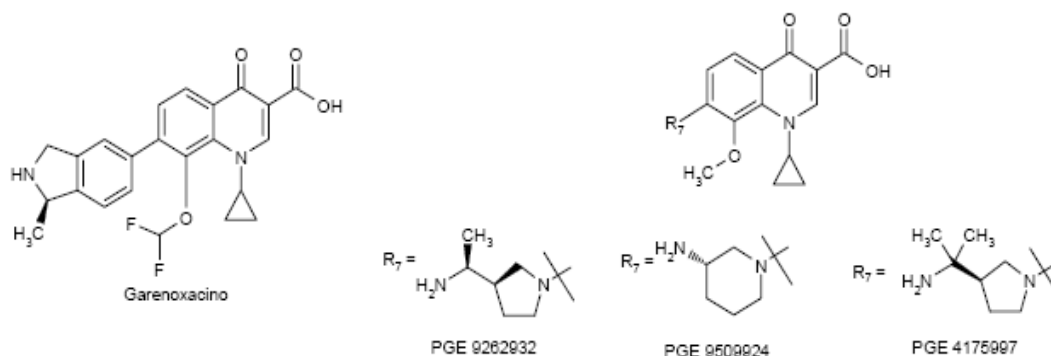


Figura 7.- 6-Desfluoroquinolonas o quinolonas no fluoradas.

▪ Sustituciones en posiciones 7.

Las sustituciones en esta posición son variables pero esenciales, al igual que en la posición 1. Esta posición interactúa directamente con la DNA-girasa o topoisomerasa IV, y será responsable de la actividad, espectro de acción, características farmacocinéticas e interacciones (Gutiérrez-Zufiaurre, 2004).

Está bien establecido que la presencia de grupos heterocíclicos nitrogenados de 5 (aminopirrolidinas) o 6 (piperazinas) átomos de carbono se corresponde con una mayor actividad:

- La presencia de una aminopirrolidina (clinafloxacin, gatifloxacin, sitafloxacin) mejora la actividad frente a Gram positivos, mientras que una piperacina mejora la actividad frente a Gram negativos (Peterson, 2001).
- Los metilderivados de piperacinas (sparfloxacin, grepafloxacin, levofloxacin) o aminopirrolidinas (gatifloxacin) mejoran la actividad frente a Gram positivos (Piddock y cols., 1998).
- La presencia de un segundo anillo fusionado a la pirrolidina (moxifloxacin, trovafloxacin) muestra buena actividad sobre Gram positivos (Appelbaum y Hunter, 2000).

Recientemente se ha observado que un radical de gran tamaño parece tener influencia en la protección de la molécula frente a mecanismos de expulsión activa, además de prevenir la aparición de resistencias y aumentar su actividad frente a anaerobios (Peterson, 2001).

▪ Sustituciones en posiciones 8.

Las sustituciones en este radical van a dar lugar a cambios en la estructura tridimensional de las moléculas, modificando la afinidad de las mismas por las topoisomerasas. Además, las sustituciones van a afectar a los parámetros farmacocinéticos, la actividad frente a anaerobios, la fototoxicidad y la genotoxicidad de la molécula (Gutiérrez-Zufiaurre, 2004).

Las quinolonas derivadas de las 4-naftiridonas no permiten ningún cambio en esta posición, ya que todas sus valencias están ocupadas, pero la presencia de este átomo de nitrógeno en posición 8 confiere a estos derivados una gran actividad *in vitro* e *in vivo* (Chu y Fernandes, 1989). En este grupo podemos encontrar al gemifloxacino o al trovafloxacino. En cambio, las moléculas derivadas de las 4-quinolonas, si permiten el modificar este radical. Podemos encontrar un radical cloro (sitafloracino y clinafloracino) o flúor (sparfloracino), que presentan un gran aumento de actividad frente a anaerobios (Appelbaum y Hunter, 2000), aunque también aumenta la fototoxicidad (Domagala, 1994).

También podemos encontrar en esta posición un grupo metoxi o metilo (moxifloxacino y gatifloxacino, respectivamente) mejorando su actividad frente a bacterias Gram positivas y anaerobios, incluso aunque estos sean resistentes a las quinolonas más antiguas, y aumenta el poder bactericida frente a *Escherichia coli* resistente a las quinolonas y *Mycobacterium tuberculosis* (Zhao y cols., 1999; Gutiérrez-Zufiaurre, 2004).

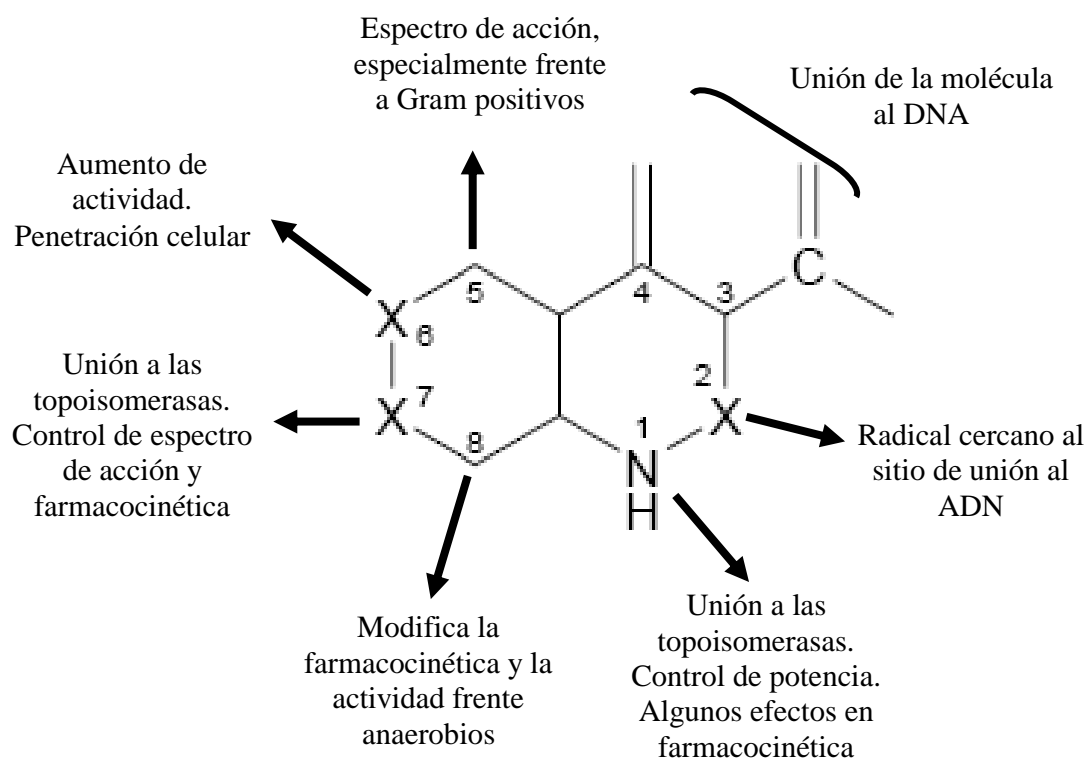
La presencia de estos radicales diferentes en la molécula de quinolona parecen determinar qué topoisomerasa será la diana principal de dicha quinolona (al menos en Gram positivos). Así pues, la presencia de un hidrógeno (ciprofloxacino) o bien de un puente entre los radicales N1 y C8 (benzoxacinas, ofloxacino y levofloxacino) parecen tener como diana principal la topoisomerasa IV, mientras que la presencia de un grupo halogenado como cloro o flúor va a determinar una mayor afinidad por la DNA-girasa (sparfloracino).

Por otro lado, los derivados de las 4-naftiridonas y los derivados de la 4-quinolona con radical metoxi en posición 8 (gatifloxacino y moxifloxacino) parece que actuarían indistintamente sobre cualquiera de las dos topoisomerasas (Peterson, 2001; Gutiérrez-Zufiaurre, 2004).

Se debe tener en cuenta que tanto la presencia del nitrógeno en X8 como el grupo metoxi o metilo, disminuyen la posibilidad de selección de cepas resistentes a partir de silvestres, cosa que no ocurre con un átomo halogeno. La presencia de un grupo metoxi junto

con un radical voluminoso en C7 previene la aparición de cepas resistentes en *Staphylococcus aureus* (Gutiérrez-Zafiaurre, 2004).

En la siguiente Figura (8) se muestra un esquema donde se relacionan los diferentes radicales con las propiedades que pueden modificar (Andersson y Macgowan, 2003).



2.5.- 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 elevado (Gobernado y Santos, 2002), fotosensibles y muy estables a la 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 1) se muestran algunas constantes de ionización de algunas quinolonas, medidas a través de métodos espectrofotométricos (Martínez y cols., 2006):

QUINOLONAS	pKa1	pKa2
Ciprofloxacino	6,0	8,8
Difloxacino	6,1	7,6
Enoxacino	6,0	8,5
Enrofloxacin	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

Tabla 1.- Constantes de ionización de diferentes quinolonas. pKa1: constante de ionización del grupo 3-carboxílico; pKa2: constante de ionización del grupo N-4 piperazínico.

Las quinolonas poseen un grupo carboxílico de carácter ácido y un grupo amino de carácter básico y por tanto son moléculas de naturaleza anfotérica (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 virtud de las condiciones más ácidas (Jenkins y Friedlander, 1988). Es al parecer debido a esta propiedad que ha sido observada cristaluria en humanos y animales (Ball, 1986).

En función del pH extracelular se pueden encontrar cuatro formas de quinolona (Figura 9):

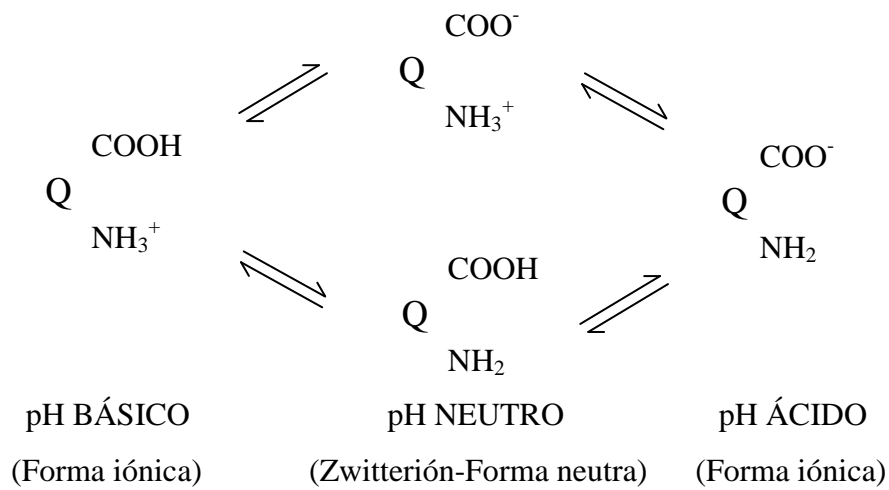


Figura 9.- Formas de quinolona en función del pH extracelular.

Así, a pH por debajo de pKa_1 las quinolonas presentan carga positiva, mientras que a pH por encima de pKa_2 tienen carga negativa. Valores bajos de pKa determinan el rango de pH dentro del cual estos antibióticos 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 zwitteriónica 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 betaine o a veces en forma de sal hidrocloreto (Merck Veterinary Manual, 1998).

Por otro lado, se ha demostrado en estudios previos, que el coeficiente de partición octanol/agua, P_{app} , de cada fluoroquinolona tiene influencia sobre las concentraciones de las mismas dentro de los microorganismos. De forma que en Gram positivos, cuanto mayor P_{app} (mayor hidrofobicidad) aumenta la concentración de fluoroquinolonas dentro de la bacteria, y en Gram negativos la concentración de fármaco aumenta cuanto menor sea P_{app} (mayor hidrofilia) (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 antimicrobiano (I/E). En las quinolonas, este cociente oscila entre 2 y 28, dependiendo del tipo de célula, de la quinolona considerada y de otros factores como el método utilizado (Gobernado, 2001). En la siguiente tabla (2) 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
Ofloxacino	6,2-8,1
Levofloxacino	6,7-9,8
Moxifloxacino	6,3
Gatifloxacino	5

Tabla 2.- Penetración de diferentes quinolonas en polimorfonucleares, según el valor adquirido del cociente I/E.

2.6.- ESPECTRO ANTIBACTERIANO.

Las 6 fluoroquinolonas tienen características diferentes al ácido nalidíxico a pesar de ser derivadas de este. Son compuestos con mayor espectro antibacteriano y menos efectos adversos.

Las quinolonas actúan específicamente sobre el DNA por lo que son rápidamente bactericidas y muestran efecto post-antibiótico (Vancutsem y cols., 1990; Mckellar, 1996). Actúan como antibióticos concentración dependientes frente a bacterias Gram negativas. Frente a Gram positivas su efecto es tiempo dependiente o una combinación de ambos efectos (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):

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

La eficacia de las fluoroquinolonas 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 en 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):

- Rápida actividad bactericida a concentraciones relativamente bajas.
- Estrecha relación entre la CMI y la concentración bactericida mínima con menor efecto de inóculo para la mayoría de los organismos.
- Prolongado efecto post-antibiótico sobre *Estafilococos*, *Enterobacterias* y *Pseudomonas*.

- No seleccionan mutantes resistentes mediados por plásmidos.
- Frecuencia de resistencia mutacional baja ($<10^{-9}$).
- No alteran la flora de *Streptococos* y anaerobios intestinales.
- Inhiben a las bacterias resistentes a los aminoglucósidos y betalactámicos.

2.6.1.- ACTIVIDAD FRENTE A COCOS GRAM POSITIVOS.

La actividad de las primeras 4-quinolonas (como el ácido nalidíxico y el cinoxacino) frente a *Streptococcus pneumoniae* era nula y solo las primeras fluoroquinolonas (enoxacino, fleroxacino, norfloxacino, lomefloxacino, rufloxacino etc.) tienen una poca actividad (Felmingham y cols., 1985; Ridgway y cols., 1985). La actividad fue mejorando en las fluoroquinolonas posteriores (ciprofloxacino, levofloxacino, sparfloxacino, trovafloxacino, moxifloxacino, gemifloxacino etc.) (Bauernfeind, 1997; Visalli y cols., 1997; Felmingham y cols., 1999; Hoellman y cols., 1999). En la Tabla 3 se especifican las CMI₅₀ y CMI₉₀ de diferentes 4-quinolonas y fluoroquinolonas frente a *Streptococcus pneumoniae*.

Cinafloxacino, gemfloxacino y sitafloxacino tienen una gran actividad, con valores de CMI₉₀ bajos, de 0,016-0,125 mg/L.

Varios estudios han demostrado la capacidad bactericida de las fluoroquinolonas frente a neumococos a concentraciones aproximadamente ocho veces su CMI (Visalli y cols., 1996; Fung-Tomc y cols., 1999).

Frente a *Streptococcus pyogenes*, las nuevas fluoroquinolonas han demostrado valores de CMI₉₀ similares a los observados contra neumococos, sobre todo gemifloxacino y sitafloxacino (Nakane y cols., 1995; Cormican y Jong, 1997).

La actividad de las primeras fluoroquinolonas, como ciprofloxacino y ofloxacino, es sólo modesta frente a *Staphylococcus aureus* sensibles a meticilina y *Staphylococcus epidermidis*, con valores de CMI₉₀ entre 0,5-1 mg/L, mejorando con grepafloxacino y sparfloxacino a valores entre 0,12-0,25 mg/L. Estudios posteriores con clinafloxacino, gatifloxacino, gemifloxacino, moxifloxacino, sitafloxacino y trovafloxacino indican mayor actividad, con valores entre 0,03-0,06 mg/L (Nekane y cols., 1995; Ednie y cols., 1997; Bauernfeind, 1997; Cormican y Jones, 1997; Woodcock y cols., 1997).

QUINOLONA	CMI (mg/L)		
	RANGO	CMI ₅₀	CMI ₉₀
Ácido nalidíxico	>128	128	>128
Cinoxacino	>128	>128	>128
Enoxacino	3,1-50	8-12,5	12,5-16
Fleroxacino	6,25-25	12,5	12,5
Norfloxacino	2-32	4-6,25	8-12,5
Lomefloxacino	2-16	4	8
Rufloxacino	1-64	8	16
Ciprofloxacino	0,5-4	1-2	2-4
Levofloxacino	0,5-2	1	2
Sparfloxacino	0,125-1	0,25	0,5
Trovafloxacino	0,06-0-5	0,125	0,25
Moxifloxacino	0,06-0-5	0,125	0,25
Clinafloxacino	0,03-0,125	0,06	0,125
Sitafloxacino	≤0,008-0,125	0,06	0,125
Gemifloxacino	≤0,004-0,25	0,016	0,016

Tabla 3.- CMI₅₀ y CMI₉₀ de diferentes 4-quinolonas y fluoroquinolonas frente a *Streptococcus pneumoniae*.

2.6.2.- ACTIVIDAD FRENTE A GRAM NEGATIVOS

Las primeras fluoroquinolonas presentaban una excelente actividad frente a Gram negativos incluyendo la mayoría de las especies de *Enterobacterias* y *Haemophilus influenzae*, y modesta actividad frente a no fermentadores, incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*. Con algunas quinolonas, al aumentar la actividad frente a cocos Gram positivos se observa una disminución de la actividad frente a Gram negativos. Con las fluoroquinolonas sintetizadas posteriormente, esta tendencia es menor, así clinafloxacino, gatifloxacino, moxifloxacino, sitafloracino y trovafloxacino conservan gran parte de la actividad de ciprofloxacino. Clinafloxacino, gemifloxacino y sitafloracino son aún más parecidos a ciprofloxacino en cuanto a actividad contra la mayoría de los Gram negativos (Nakane y cols., 1995; Ednie y cols., 1997; Cormican y Jones., 1997).

Frente a especies de *Kebsiella* y *Enterobacter* resistentes a ciprofloxacino, sitafloxacino y clinafloxacino, han demostrado una gran actividad en comparación con otras nuevas fluoroquinolonas (Deguchi y cols., 1997; Brisse y cols., 1999).

En cuanto a la actividad frente a *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*, destaca que son altamente susceptibles a la mayoría de las fluoroquinolonas. Ciprofloxacino y ofloxacino tienen excelente actividad, la cual no se ha perdido con los nuevos compuestos, la mayoría con igual actividad que ciprofloxacino. Clinafloxacino y gemifloxacino han mejorado ligeramente su actividad (Bauernfeind, 1997).

Han aparecido cepas de *Haemophilus influenzae* resistentes a fluoroquinolonas y la actividad de las nuevas fluoroquinolonas frente a éstas ha disminuido, con una CMI₉₀ entre 1-2 mg/L para la mayoría de los compuestos. Gemifloxacino ha demostrado ser más activa que otras fluoroquinolonas frente a estas especies resistentes, con una CMI₉₀ de 0,25 mg/L (Davies y cols., 1999).

2.6.3.- ACTIVIDAD FRENTE A GRAM NEGATIVOS NO FERMENTADORES

Entre las especies Gram negativas no fermentadoras se encuentran *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *Alcaligenes spp.*, *Stenotrophomonas spp.* y *Burkholderia spp.* Las primeras 6-fluoroquinolonas (ciprofloxacino, ofloxacino y levofloxacino) tienen una actividad variable frente a éstas especies.

Ciprofloxacino es generalmente más activo que los nuevos agentes contra la mayoría de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Ofloxacino, levofloxacino y sparfloxacino tienen una pobre actividad y gatifloxacino, gemifloxacino, moxifloxacino y trovafloxacino tienen una actividad más parecida a ciprofloxacino (Cormican y Jones, 1997; Woodcock y cols., 1997; Visalli y cols., 1997). Por el contrario, clinafloxacino y sitafloxacino tienen una actividad igual o mejor que ciprofloxacino (Nakane y cols., 1995; Bauernfeind, 1997; Ednie y cols., 1997; Visalli y cols., 1997). Además, clinafloxacino tiene mayor actividad que otras fluoroquinolonas contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a quinolonas, aunque las CMI_s sean considerablemente más elevadas que contra especies sensibles (1-8 mg/L) (Ednie y cols., 1997). También sitafloxacino tiene mejor actividad frente a cepas resistentes a *Pseudomonas aeruginosa*, vinculado principalmente por el cloro en posición 8, sustituyente causante de su fototoxicidad (Nakane y cols., 1995; Kitamura y cols., 1995).

Acinetobacter spp. tienen una respuesta, en general, bimodal frente a las quinolonas. Se ha estudiado la actividad de las nuevas quinolonas frente a especies sensibles a ciprofloxacino y se ha comprobado que son más activas que ciprofloxacino (Nakane y cols., 1995; Ednie y cols., 1997; Cormican y Jones, 1997), pero frente a cepas resistentes a quinolonas todos los compuestos tienen menor actividad. Clinafloxacino y sitafloxacino conservan una mayor actividad, aunque sus valores de CMI₉₀ son elevados (1-4 mg/L) (Ednie y cols., 1997).

2.6.4.- ACTIVIDAD FRENTE A ANAEROBIOS

La actividad de las primeras fluoroquinolonas (ciprofloxacino, ofloxacino, levofloxacino, pefloxacino y enoxacino) frente a anaerobios del grupo de *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium spp.*, *Prevotella spp.*, *Porphyromonas spp.* y *Clostridium spp.*, entre otros, era dudosa y variable (Appelbaum, 1995). Las nuevas moléculas de fluoroquinolonas han demostrado una mejor actividad frente a anaerobios. Sparfloxacino y grepafloxacino tienen mejor actividad que ciprofloxacino, ofloxacino y levofloxacino, pero no son tan activas como gatifloxacino, moxifloxacino, sitafloxacino y trovafloxacino (MacGowan y cols., 1997; Ednie y cols., 1998; Goldstein y cols., 1999).

La actividad de las nuevas fluoroquinolonas frente a *Clostridium difficile* es buena, la mayoría con clara mejoría en comparación con ciprofloxacino (Spencer, 1998).

2.6.5.- ACTIVIDAD FRENTE A PATÓGENOS ATÍPICOS

Mycoplasma spp., *Chlamydia spp.* y *Legionella pneumophila*, son patógenos reconocidos como causantes de enfermedades del aparato respiratorio. Las primeras 4-quinolonas tenían una insignificante o, en el mejor de los casos, modesta actividad frente a éstos patógenos (Heessen y Muytjens, 1984; Ridgway y cols., 1984) y moderada frente a *Legionella pneumophila* (Deforges y cols., 1986). Las primeras 6-fluoroquinolonas como ciprofloxacino, ofloxacino y levofloxacino, presentan una mayor actividad (Felmingham y cols., 1985). Los nuevos agentes tienen una gran actividad pudiendo compararse con los macrólidos y con doxiciclina, como ocurre con trovafloxacino, gatifloxacino, moxifloxacino y gemifloxacino. La Tabla 4 muestra un resumen de los resultados de estos compuestos en comparación con los macrólidos y doxiciclina frente *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Legionella pneumophila* y *Mycoplasma pneumoniae* (Felmingham y cols., 1985;

Wise y cols., 1997; Woodcock y cols., 1997; Roblin y cols., 1997; Jones y cols., 1997; Dubois y St-pierre, 1999).

COMPUESTO	VALOR CMI (mg/L)			
	<i>C. pneumoniae</i>	<i>C. trachomatis</i>	<i>L.pneumophila</i>	<i>M.pneumoniae</i>
Ciprofloxacino	2	-	0,016-0,25	0,5-2-5
Ofloxacino	0,25-2	1-4	0,008-0-03	1-2
Levofloxacino	0,25-1	0,25-0,5	0,016	-
Grepafloxacino	0,06-0,5	0,06-0,12	0,008-0,05	0,06-0,5
Gatifloxacino	0,06-0,25	0,06-0,25	0,016-0,03	0,05-0,13
Moxifloxacino	0,03-0,5	0,03-0,125	0,016	0,06-0,12
Trovafloxacino	0,12-1	0,12	≤0,008-0,06	0,06-0,25
Gemifloxacino	0,06-1	0,03-0,12	0,016	0,05-0,1
Eritromicina	0,025-0,5	0,06-0,5	0,03-1	0,01-0,05
Claritromicina	0,03-0,25	0,004-0,03	0,015-0,06	0,004-0,03
Azitromicina	0,015-0,5	0,12	0,25	0,001-0,0025
Doxiciclina	0,06-0,5	0,03-0,12	-	0,06-2,5

Tabla 4.- Actividad de fluoroquinolonas, macrólidos y doxiciclina frente a distintos patógenos atípicos.

2.7.- EFECTO POST-ANTIBIÓTICO DE LAS QUINOLONAS

Uno de los primeros autores en describir este efecto fue Bigger en 1944, en *Staphylococcus spp.* y *Streptococcus spp.*, previamente expuestos a penicilina G (Parker y Marsh, 1946). Más tarde, en los años 70, empieza a cobrar importancia, cuando se encuentra este fenómeno en varios antimicrobianos nuevos y también en bacterias Gram negativas (Mc. Donald y cols., 1976; Wilson y Rounson, 1979). Así, se definió el término de “efecto post-antibiótico” (EPA), encontrándose su mayor aplicación clínica en la posibilidad de espaciar los regímenes de dosificación de un antimicrobiano sin perder eficacia, y se estandarizan las técnicas para valorarlo.

El efecto post-antibiótico (EPA) se define como la supresión de crecimiento bacteriano que persiste tras una limitada exposición de los microorganismos a un antimicrobiano (Mc. Donald y cols., 1977).

Los antimicrobianos que actúan a nivel del ribosoma, RNA o DNA como los aminoglucósidos, quinolonas y macrólidos, inhiben la síntesis de proteínas. Así, el EPA podría significar un período de resíntesis de estas proteínas necesarias para el metabolismo o el crecimiento bacteriano y si la unión del antimicrobiano es irreversible la actividad persiste aunque éste haya sido retirado (Vogelman y Craig, 1985).

Existen diferentes factores que pueden influir en la duración del EPA:

- Tipo de antimicrobiano y microorganismo: Es el factor que más influye en la duración del EPA tanto “*in vitro*” como “*in vivo*”. En general se puede decir que influye si la bacteria es Gram-positiva o Gram-negativa, la especie microbiana, si es anaerobia o no, su resistencia, etc. El antimicrobiano es importante puesto que cada uno posee diferente grado de acción sobre las distintas bacterias y por tanto diferente capacidad de “daño” celular (Vogelman y Craig, 1985; Vogelmann y cols., 1988; Craig y Gudmundsson, 1991).
- Concentración de antimicrobiano: Para que se produzca EPA es necesario una concentración adecuada del antimicrobiano. En muchos antibióticos el EPA parece ser proporcional a la concentración (aminoglucósidos, quinolonas) aunque hay otros parámetros que también influyen (concentración máxima en plasma, dosis total, etc...) (Chin y Neu, 1987; Vogelmann y Craig, 1985; Vogelmann y cols., 1988; Dalhoff y Ullmann, 1990).

- Duración de la exposición: El tiempo en que los niveles de antimicrobiano permanecen por encima de la CMI aumenta, en general, la duración del EPA. Se debe tener precaución en no provocar una excesiva muerte bacteriana ya que esto nos dificultaría la detección del crecimiento. Este factor está ligado, en algunos casos, a la concentración del antimicrobiano y otros parámetros que expresan “*in vivo*” la farmacocinética de un antibiótico, como el área bajo la curva (ABC o AUC), el nivel máximo de concentración, etc. (Gobernado y Santos, 1988).
- Fase de crecimiento del microorganismo: Normalmente se utilizan en todas las técnicas bacterias en fase logarítmica de crecimiento, pero hay antimicrobianos que actúan también sobre microorganismos en fase estacionaria. Este puede ser un factor importante, sobre todo “*in vivo*” y con antibióticos de vida media larga (Smith y Lewin, 1988).

Además, durante este período post-antibiótico se pueden observar los siguientes efectos:

- Cambios morfológicos: 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 *Staphylococcus aureus* durante la fase EPA (Pastor y Cantón, 1999).
- Mayor susceptibilidad a la acción de los leucocitos (postantibiotic leukocyte enhancement o PALE): este fenómeno hace referencia a la mayor susceptibilidad de las bacterias en fase de EPA para ser fagocitadas por los leucocitos. El PALE fue observado por Mc. Donald y Pruul (Mc. Donald y cols., 1981) y más tarde por otros investigadores en bacterias Gram negativas y Gram positivas.

El EPA 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 post-antibiótico. Así, se encuentra el “efecto post-antibiótico *in vitro*” o periodo de tiempo durante el cual no existe crecimiento bacteriano tras una breve exposición de los microorganismos al antimicrobiano y “efecto post-antibiótico *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).

Las quinolonas producen un EPA 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 (entre 90 y 180 minutos). Las quinolonas producen efectos post-antibióticos inferiores a 3 horas sobre *Staphylococcus aureus*, con la excepción de sparfloxacino 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 uno aún más corto (<60 minutos). Sobre las bacterias Gram negativas, las quinolonas inducen efectos post-antibióticos 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 EPA menor de 1,5 horas (Gobernado y Santos, 2002).

Existen varias hipótesis sobre a qué se debe el EPA:

- La alteración de los factores de virulencia bacteriana, como la alteración de la actividad hemolítica observada sobre *Escherichia coli* en presencia de quinolonas; la disminución de la síntesis de proteasas y exotoxina A de *Pseudomonas 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 y Aliabadi, 2002b).
- La inhibición de la bomba de flujo, que ha sido demostrada durante la fase de EPA (Lees y Aliabadi, 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).

La aplicación más importante del EPA está en los protocolos de dosificación de los antimicrobianos. Así, determinadas combinaciones de microorganismo-antimicrobiano que induzcan un EPA prolongado podrán administrarse de forma intermitente sin miedo a perder eficacia. Las ventajas de este tipo de dosificación se traducirían en una dosificación más cómoda, reducción de los riesgos de toxicidad y disminución de los costes sanitarios (material desechable, personal especializado para pinchar, etc) (Esposito y cols., 1988; Tulkens, 1991).

2.8.- RESISTENCIAS BACTERIANAS

Las quinolonas para ejercer su efecto citotóxico deben penetrar a través de la membrana bacteriana para poder alcanzar su diana celular, la DNA-girasa o la topoisomerasa IV, y de esta forma producir la muerte celular. Es por ello, que las resistencias a quinolonas pueden deberse a mutaciones que afecten cualquier paso de este proceso (Taléns-Vistonti y cols., 2002).

El amplio espectro de actividad antimicrobiana, y el excelente comportamiento farmacocinético, han hecho de las nuevas fluoroquinolonas agentes muy atractivos para el tratamiento de enfermedades infecciosas severas, tanto en el hombre como en los animales. Sin embargo, se ha informado una alarmante tasa de resistencia bacteriana en aislados clínicos humanos, y hay evidencias que indican la emergencia de bacterias resistentes en animales tratados. La mayor incidencia de bacterias resistentes a fluoroquinolonas en personas no expuestas a estos agentes podría ser el resultado del uso extensivo de estos antimicrobianos en medicina veterinaria (Otero y cols., 2001).

Las resistencias bacterianas pueden agruparse en distintas categorías:

- Alteraciones en las dianas.
- Alteraciones en la permeabilidad bacteriana.
- Resistencia por los sistemas de flujo.
- Otros mecanismos de resistencia.

Cada uno de los mecanismos de resistencia a las fluoroquinolonas puede ocurrir simultáneamente en la misma célula, conduciendo a elevados niveles de resistencia. Hasta la fecha, no se ha sido descubierto mecanismos basados en la modificación/inactivación enzimática de las quinolonas, ya que estas son antibióticos sintéticos que no tienen análogos naturales, y por tanto, es menos común que aparezca este tipo de mecanismo (Wolfson y Hooper, 1989).

2.8.1.- ALTERACIONES EN LAS DIANAS

Estas resistencias son de tipo cromosómico que dan lugar a mutaciones de los cromosomas en segmentos definidos de los genes que se traducen en alteraciones en la DNA-girasa y la topoisomerasa IV, dando lugar a las QRDR (región determinante en la aparición de resistencias bacterianas a las quinolonas) (Wolfson y Hooper, 1989; Nakamura, 1997).

Los primeros estudios realizados en *Escherichia coli* sostienen que la principal causa de resistencia a quinolonas es debida a mutaciones en la subunidad GyrA y en menor grado en la subunidad GyrB de la DNA-girasa (Cullen y cols., 1989; Yoshida y cols., 1990). Las mutaciones en las regiones equivalentes de las proteínas ParC y ParE de la topoisomerasa IV tienen lugar posteriormente (Heisig, 1996). Concretamente es en el residuo de serina 83 (Ser83) y aspartato 87 de la subunidad gyrA y en la serina 79 y aspartato 83 de parC de *Escherichia coli* donde se produce la resistencia a diversas quinolonas y en sus sitios análogos en otras especies (Piddock y Johnson, 2002; Bebear y cols., 2003).

Estudios en los genes de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* muestran que la situación puede ser al contrario en bacterias Gram positivas, donde la topoisomerasa IV (codificada por grlA y grlB) es el objetivo primario de las quinolonas (Muñoz y De La Campa, 1996).

En ambos casos, las mutaciones disminuyen la afinidad de la quinolona por el complejo enzima-DNA y permiten continuar con la replicación del DNA en presencia de concentraciones de quinolonas que son inhibitorias del crecimiento celular (Martínez y cols., 2006).

Los mayores aportes al respecto han sido efectuados en *Streptococcus pneumoniae*, los cuales también han revelado que la relación entre estructura y actividad de las quinolonas puede ser diferente para cada especie bacteriana (Hooper, 2000; Taléns-Viscont y cols., 2002). Así, de acuerdo al orden mutacional en las QRDR de la DNA-girasa y topoisomerasa IV, los mutantes resistentes de *Streptococcus pneumoniae* se pueden agrupar en tres clases:

- El primer grupo, inicialmente identificado por su resistencia al ciprofloxacino y también al levofloxacino, norfloxacino, perfloxacino y trovafloxacino, se caracteriza por presentar mutaciones en la topoisomerasa IV antes que en la DNA-girasa, lo que sugiere que *in vivo*, estos fármacos actúan preferentemente sobre la primera enzima.
- Un segundo grupo de mutantes, compuesto por resistentes al sparfloxacino, grepafloxacino, gatifloxacino, moxifloxacino y NSFQ-105 (homólogo al ciprofloxacino con un grupo 4-4-aminofenilsulfonil-1- piperacínilo en el C-7), presenta mutaciones en la DNA-girasa antes que en la topoisomerasa IV, lo que señala a aquella como su diana principal.
- Finalmente, el clinafloxacino y gemifloxacino actúan sobre ambas dianas, la DNA-girasa y la topoisomerasa IV, aunque se generan en primer lugar mutaciones en gyrA y gyrB, estas mutaciones suceden con bajas frecuencias, lo que indica que

ambas contribuyen de forma importante en la acción del fármaco (Taléns-Visconti y cols., 2002).

En resumen podemos decir que la DNA-girasa es la diana principal en microorganismos Gram negativos, mientras que en bacterias Gram positivas la diana principal es la topoisomerasa IV. Así, las primeras mutaciones en Gram negativos las encontraremos en el gen *gyrA*, mientras que en Gram positivos las encontraremos en el gen *parC* (*grlA* para *Staphylococcus aureus*).

2.8.2.- ALTERACIONES EN LA PERMEABILIDAD BACTERIANA

La resistencia a las fluoroquinolonas producida por mutaciones conlleva una disminución de la susceptibilidad o resistencia a esta clase de antibióticos, tanto en quinolonas de uso humano como en veterinaria (Everett y cols., 1996; Piddock y cols., 1998). Sin embargo, las resistencias producidas por una disminución de la permeabilidad o alteración de las bombas de flujo, son menos específicas, generando múltiples resistencias cruzadas a otros antibióticos no relacionados estructuralmente, como cefemas, penemas y tetraciclinas (Poole, 2000).

Las quinolonas son moléculas hidrofílicas, que atraviesan la membrana externa de bacterias Gram negativas a través de los canales de porinas. Tanto su tamaño como su topología son compatibles para el ingreso de éstas a través de las porinas OmpF y OmpC (Giraud y cols., 2000). Se ha sugerido que las moléculas más hidrofóbicas podrían estimular por sí mismas su difusión a través de la capa de fosfolípidos, gracias a su capacidad de quelación del magnesio, que se halla en la membrana externa estabilizando el lipopolisacárido (Nikaido y Thanassi, 1993; Giraud y cols., 2000).

Se han descrito numerosos mutantes de permeabilidad que modifican la sensibilidad a quinolonas hidrofílicas, aunque la resistencia de dichos mutantes no es muy elevada. Se reporta que mutaciones en los genes *ompF* y *ompC* dan lugar a una escasa o nula resistencia y éstas se caracterizan por presentar variaciones en las concentraciones de las porinas OmpF y OmpC. Paralelamente, mutaciones en los genes *nfxB*, *norB*, *norC*, *nfxC* y *cfxB* parecen estar asociados a una menor permeabilidad a través de los canales OmpF, así como a una menor permeabilidad a otras moléculas como tetraciclina, cloranfenicol o algunos beta-lactámicos (Wolfson y Hooper, 1989). Por otro lado, mutaciones en los loci *nfx*, *mar*, *cfx* y *sox*, involucrados en la respuesta frente a condiciones medio ambientales adversas, dan lugar a resistencia frente a muchas moléculas diferentes, incluidas las quinolonas. A pesar de esto, no existen demasiados resultados concluyentes respecto a las mutaciones que afectan a la

membrana externa ni las alteraciones en la membrana citoplasmática que pudieran afectar al transporte de dichos compuestos.

Por otro lado, las cepas mutantes Mar (múltiple antibiotic resistant) expresan resistencias condicionadas por cromosomas frente a una gran variedad de antibióticos hidrofóbicos e hidrofílicos estructuralmente no relacionados, entre ellos las quinolonas. Esto es consecuencia de que las mutaciones en *marA* reducen la permeabilidad al disminuir la expresión de la OmpF. Las mutaciones que afectan a la permeabilidad confieren bajos grados de resistencia a las quinolonas (aumento de 2 a 4 diluciones log₂ de la CMI), pero habitualmente se producen resistencias cruzadas con otros antibióticos estructuralmente no relacionados (Cohen y cols., 1988; Cohen y cols., 1989).

2.8.3.- RESISTENCIA POR LOS SISTEMAS DE FLUJO

Los sistemas de flujo se caracterizan por expulsar al exterior celular un considerable número de moléculas, como antibióticos de distintas familias estructurales y en muchos casos antisépticos, biocidas, compuestos aromáticos y detergentes. Entre sus características está su inespecificidad y su ubicuidad, habiéndose descrito en todas las especies bacterianas analizadas (así como en células eucariotas). Una única célula bacteriana puede tener hasta 20 sistemas de flujo distintos (Sánchez Díaz, 2003).

Uno de los más conocidos es el sistema de transporte denominado AcrAB de *Escherichia coli*, el cual está codificado en los genes *acrAB* y parece tener como función fisiológica la protección de las células frente a sales biliares y ácidos grasos que son tóxicos habituales de su entorno fisiológico. Este sistema se sitúa en la membrana interna de los microorganismos y es un proceso inespecífico y dependiente de energía, ligado a un gradiente de protones. El sistema AcrAB está compuesto por el transportador AcrB y la proteína periplasmática accesoria AcrA. Se cree que AcrA, de forma alargada, aproxima la membrana externa e interna, formando un trímero que interacciona con el monómero AcrB; bombeando así una gran variedad de sustancias, incluida las quinolonas, presumiblemente a través del canal TolC (Nikaido, 1996; Nikaido y Zgurskaya, 2001)

Es importante destacar que la expresión de los genes *acrAB* aumentan de forma considerable en los mutantes Mar, lo que implica que dicho locus en *Escherichia coli*, no solo regula la expresión de la porina OmpF, sino también la expresión de la bomba AcrAB. Los mutantes Mar presentan resistencias a quinolonas, debido a una disminución en la permeabilidad de la membrana externa y a una importante expulsión activa a través de la

membrana interna (Ma y cols., 1995; Zeller y cols., 1997; Giraud y cols., 2000; Weber y Pidcock, 2003).

Otros transportadores similares son el codificado por el gen *mexABoprK* de *Pseudomonas aeruginosa*, relacionado con la resistencia de esta bacteria a ciprofloxacino y ácido nalidíxico (Poole y cols., 1993), y en bacterias Gram positivas las bombas de expulsión Bmr en *Bacillus subtilis* y NorA en *Staphylococcus aureus* (Neyfak, 1992; Neyfak y cols., 1991). En la Tabla 5 se muestran diferentes bombas de expulsión en especies Gram positivas.

ESPECIE	BOMBAS DE EXPULSIÓN
<i>Staphylococcus aureus</i>	Nor A, Nor B, MsrA, QacA,B, TetK
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	PmrA, Mef E
<i>Listeria monocytogenes</i>	MdrL, Lde
<i>Bacillus subtilis</i>	Bmr, Blt, EbrAB
<i>Enterococcus faecalis</i>	Lsa, EmeA
<i>Streptococcus pyogenes</i>	MefA
<i>Lactococcus lactis</i>	LmrA, LmrP
<i>Corynebacterium spp</i>	LmrB

Tabla 5.- Principales bombas de expulsión en Gram positivos.

2.8.4.- OTROS MECANISMOS DE RESISTENCIA.

Resistencia mediada por plásmidos

No se han descrito mecanismos de resistencia mediados por plásmidos en bacterias Gram positivas, mientras que sí se ha hecho en bacterias Gram negativas tales como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Este mecanismo está mediado por un gen plasmídico llamado *qnr* (Tran y Jacoby, 2002; Rodríguez-Martínez y cols., 2003; Wang y cols., 2003). Este gen se detectó en un plásmido conjugativo, en una estructura tipo integrón, en una cepa de *Escherichia coli* de origen urinario (Martínez-Martínez y cols., 1998).

Este mecanismo de resistencia aumenta la resistencia de las cepas de 4 a 8 veces y complementa a otros mecanismos de resistencia como la adquisición de mutaciones o a los sistemas de expulsión activa. El mecanismo de acción de Qnr se basa en la unión de esta proteína a la DNA-girasa; esta unión no requiere la presencia del complejo DNA-girasa-Quinolona-DNA para su formación. Se postula que la formación del complejo Qnr-DNA-girasa ocurre antes del bloqueo de la DNA-girasa por parte de la quinolona. Además, se ha

observado una reducción en la formación del complejo en presencia de Qnr (Rodríguez-Martínez, 2005; Tran y cols., 2005).

2.9.- PREVENCIÓN DE RESISTENCIAS

Las fluoroquinolonas, han sido recientemente reclasificadas en Europa, teniendo en cuenta, no sólo el concepto de Dosis Concentración Dependiente (Walker y Dowling, 2006), sino también el de Concentraciones Preventivas de Mutaciones (MPC), que se define como la concentración más baja de un fármaco capaz de prevenir el crecimiento de las cepas mutantes resistentes, de primer paso, menos susceptibles. La resistencia a las fluoroquinolonas se puede producir de forma espontánea en poblaciones de bacterias lo que implica mutaciones en el gen que codifica las dianas terapéuticas, como son la ADN-girasa y la topoisomerasa IV (Wetzstein H.G., 2005; Kesteman y col., 2009).

El uso de los índices farmacocinéticos/farmacodinámicos (PK/PD), se considera necesario para optimizar las estrategias de tratamiento y reducir el desarrollo de resistencias bacterianas (Lathers, C.M., 2002; McKellar y col., 2004, Toutain y Lees, 2004). En este sentido, se ha propuesto un nuevo enfoque en la prevención de la aparición de resistencia a los antimicrobianos, que consiste en la administración del fármaco a dosis que consigan unas concentraciones plasmáticas que superen en todo momento el umbral que presentan las cepas mutantes espontáneas, resistentes a los medicamentos y evitar así el crecimiento y amplificación selectiva de cualquier subpoblación mutante. Además, se ha sugerido que la amplificación selectiva de las cepas mutantes espontáneas resistentes a los fármacos, es más pronunciada en el intervalo de concentraciones plasmáticas de dicho fármaco entre la MIC para la población de campo (silvestre) y la MPC. Este intervalo se define como la ventana de selección de mutantes (MSW) (Kesteman y col., 2009).

Por otro lado, el parámetro MIC se relaciona con las poblaciones sensibles a los medicamentos y no es adecuado para la prevención del crecimiento de mutantes resistentes. Teóricamente, para prevenir el desarrollo de mutantes resistentes, las concentraciones del antimicrobiano deben superar durante el mayor tiempo posible las MPC (Pasquali y Manfreda 2007), y este hecho no se tiene en consideración con los índices de eficacia clásicos AUC/CMI o C_{max}/CMI, o el aplicado en antimicrobianos tiempo dependiente T>CMI. Por ello, algunos autores han sugerido nuevos índices de eficacia, T> MPC (tiempo en el que las concentraciones del fármaco superan las MPC) y AUC/MPC, que podrían ser buenos predictores para la prevención de la aparición de resistencias (Olofsson y col., 2006, Olofsson

y col., 2007). Por tanto, la situación ideal o más deseable cuando se lleva a cabo un tratamiento antimicrobiano eficaz y que a su vez no promueva el incremento de resistencias, es que se instaure la terapia lo antes posible, de forma que el tamaño del inóculo o carga bacteriana en el animal sea la menor posible (metafilaxis o profilaxis) (Kesteman y col., 2009), y si esto no ha sido posible, conseguir unos niveles plasmáticos y tisulares por encima de la ventana de selección de mutantes.

2.10.- INTEGRACIÓN FARMACOCINÉTICA-FARMACODINÁMICA (PK/PD)

La relación entre la farmacocinética y la actividad microbiológica (farmacodinámica) de las fluoroquinolonas puede ser usada con el fin de determinar la dosis necesaria para lograr el resultado clínico deseado. Desde esta perspectiva (PK/PD), las quinolonas son antibióticos concentración dependiente (Zhanel, 2001), aunque existan excepciones a esta regla general ya que según describe Cester y cols., 1996, las fluoroquinolonas pueden actuar como antibióticos concentración dependiente frente a bacterias Gram negativas, y tiempo dependiente o una combinación de ambos efectos frente a Gram positivas.

Los parámetros que mejor se relacionan con la eficacia de un antibiótico concentración dependiente son las relaciones AUC_{0-24h} / CMI (área bajo la curva/concentración mínima inhibitoria) y C_{max} / CMI (concentración máxima/concentración mínima inhibitoria), ya que a priori se consigue un mayor efecto bactericida (mayor eliminación de bacterias) cuanto mayor es la concentración en contacto con esas bacterias.

La ratio C_{max} / CMI es particularmente importante en presencia de bacterias con CMIs elevadas o en presencia de bacterias con una capacidad de proliferación elevada (Craig y Dalhoff, 1998). En este último caso, las bacterias tienen una mayor probabilidad de sufrir una mutación, que podría conducir a la creación de una población bacteriana menos susceptible. En los procesos infecciosos donde hay una alta carga bacteriana, el proceso de mutación está aumentado simplemente por las leyes de la probabilidad (Drusano y cols., 1993; Craig y Dalhoff, 1998). Diversas investigaciones han demostrado que las fluoroquinolonas con un ratio $C_{max} / CMI_{90} > 3$ provocan una reducción en el recuento bacteriano de un 99%, mientras si la ratio $C_{max} / CMI_{90} \geq 8$, previenen la aparición de microorganismos resistentes (Craig, 1998). Estos ratios aseguran un incremento de la mortalidad de organismos sensibles, un aumento de la mortalidad o inhibición de bacterias con altos valores de CMIs y, por tanto, un

menor número de microorganismos que facilita la acción de las defensas orgánicas cuando las concentraciones sistémicas del antibiótico son mínimas. Altas concentraciones de antibiótico, en relación a la CMI de los microorganismos, también contribuyen a incrementar el EPA. El EPA *in vivo*, es mayor que *in vitro* para la mayoría de los microorganismos, a excepción de los estreptococos β -hemolíticos. Por consiguiente, la adecuación de la ratio C_{\max} / CMI_{90} será fundamental para retrasar el recrecimiento de patógenos, por varias horas. El resultado de usar este tipo de regímenes de dosificación es que existirá una menor cantidad de microorganismos capaces de producir subpoblaciones resistentes.

A pesar de que existe una gran cantidad de información sugiriendo que las fluoroquinolonas son altamente efectivas en presencia de un alto ratio C_{\max} / CMI_{90} , se han observado excepciones que rompen la regla. Por ejemplo, en el caso de *Bacillus anthracis*, ciertos estudios han sugerido que la ratio AUC/CMI es mejor para predecir el éxito que la ratio C_{\max} / CMI_{90} (Deziel y cols., 2001). También hay que tener en cuenta el tiempo transcurrido entre dosis, si este tiempo es superior a 24 horas (como en el caso del gemifloxacino), la efectividad puede depender del tiempo en que la concentración de fármaco excede de la CMI ($T > CMI$) (MacGowan y cols., 2001).

Cuando no es posible una ratio $C_{\max} / CMI_{90} > 8$, la importancia del tiempo de exposición al fármaco se ve aumentada, y la eficacia dependerá de la ratio AUC/CMI (Owens y Ambrose, 2002). La ratio AUC/CMI también sirve como índice PK/PD cuando la infección está provocada por bacterias de crecimiento lento, cuando existe poco o nulo EPA, o cuando las CMIs de los microorganismos son bajas.

Una gran cantidad de estudios en modelos animales (basados en infecciones causadas por Gram negativos) han mostrado que un valor de AUC/CMI de 100 o mayor, ha sido necesario para asegurar su supervivencia (Craig, 1998; Craig y Dalhoff, 1998; Thomas y cols., 1998). Este valor de 100, si lo trasladamos a concentración de fármaco, equivale aproximadamente a 4 veces la CMI a lo largo de un intervalo de 24 horas de dosificación (concentraciones *in vitro* de difloxacino necesarias para asegurar el efecto bactericida contra cepas aisladas en perros que padecen infección recurrente del tracto urinario) (Walker, 2000). La ratio AUC/CMI tiene una gran importancia en el resultado clínico observado con moxifloxacino (Vesga y cols., 1996), ciprofloxacino (Forrest y cols., 1993) y grepafloxacino (Forrest y cols., 1997).

Diversos estudios han publicado que los valores de AUC/CMI necesarios para asegurar un resultado terapéutico exitoso, pueden ser diferentes para infecciones causadas por Gram negativos y Gram positivos:

- Para organismos Gram negativos, el valor de AUC/CMI necesario para asegurar la cura bacteriana y la prevención de cepas resistentes es de 100-125 (Forrest y cols., 1993).
- En contraste, la ratio AUC/CMI para bacterias Gram positivas es considerablemente menor, aproximadamente 30-50 (Prest; Wright y cols., 2000; Ibrahim y cols., 2002).

Las investigaciones con fluoroquinolonas de tercera generación, han sugerido que en microorganismos Gram positivos los valores de AUC/CMI son substancialmente menores cuando $C_{\max}/CMI \geq 10$ (Nightingale y cols., 2000). Además, Lees y Shojaee Aliabadi (2002a) han realizado investigaciones de la ratio AUC/CMI obteniendo un efecto bacteriostático, bactericida y eliminación total bacteriana con varias fluoroquinolonas. En todos los casos, este índice fue menor de 100-125 para terneros, ovejas, cabras y camellos.

Por tanto, la integración PK/PD es una guía para obtener estimaciones iniciales de dosis, que son necesarias para alcanzar la respuesta clínica deseada, modificar un régimen de dosificación en pacientes que tienen alterado el aclaramiento, o para calcular una dosis basándose en la información de la susceptibilidad de organismos patógenos. Sin embargo, no es correcto usar estos índices para asegurar la efectividad de un producto o para comparar productos. Hay numerosos factores farmacocinéticos y farmacodinámicos que no pueden predecirse. Por ejemplo, la concentración plasmática de un fármaco no necesariamente refleja la capacidad de este para penetrar en el sitio de infección o en el interior de la célula bacteriana (MacGowan y Bowker, 2002).

La actividad bactericida de un antibiótico puede alterarse por modificaciones en la relación pH intracelular/pKa del fármaco, contenido en oxígeno y actividad enzimática intracelular (Butts, 1994). Además, la potencia de un antibiótico es frecuentemente considerada en términos de CMI, que es un efecto estático sobre el crecimiento bacteriano. La CMI de un antibiótico puede no ser igual que su concentración bactericida mínima (CBM ó MBC). Desde el momento que los valores de CMI y CBM de un antibiótico son estimados *in vitro*, estos no reflejan la capacidad antimicrobiana *in vivo* por numerosos factores (Craig y Dalhoff, 1998). Mientras que se ha demostrado que algunas fluoroquinolonas tienen actividad *in vitro* e *in vivo* contra bacterias en fase estacionaria (por ejemplo, ofloxacino y

ciprofloxacino), otras no (por ejemplo, norfloxacino) (Lode y cols., 1998). También tenemos que tener en cuenta que una vez que hemos alcanzado un determinado valor de la ratio AUC/CMI o C_{\max} /CMI para un determinado antibiótico, el incremento de estas ratios no aumenta su eficacia clínica, ya que elevadas concentraciones de fluoroquinolonas inhiben la síntesis de ARN y la síntesis proteica, provocando una disminución en su actividad bactericida (Lode y cols., 1998).

Últimamente, diversos estudios indican que la integridad de la respuesta inmune del animal, también determinará la efectividad de la integración PK/PD (Andes y Craig, 2002; Toutain y cols., 2002).

2.11.- UTILIZACIÓN CLÍNICA DE LAS FLUOROQUINOLONAS

Las indicaciones clínicas de las quinolonas han ido variando al mismo ritmo que iban evolucionando, mejorando su espectro de actividad y sus propiedades farmacocinéticas (Figura 10).

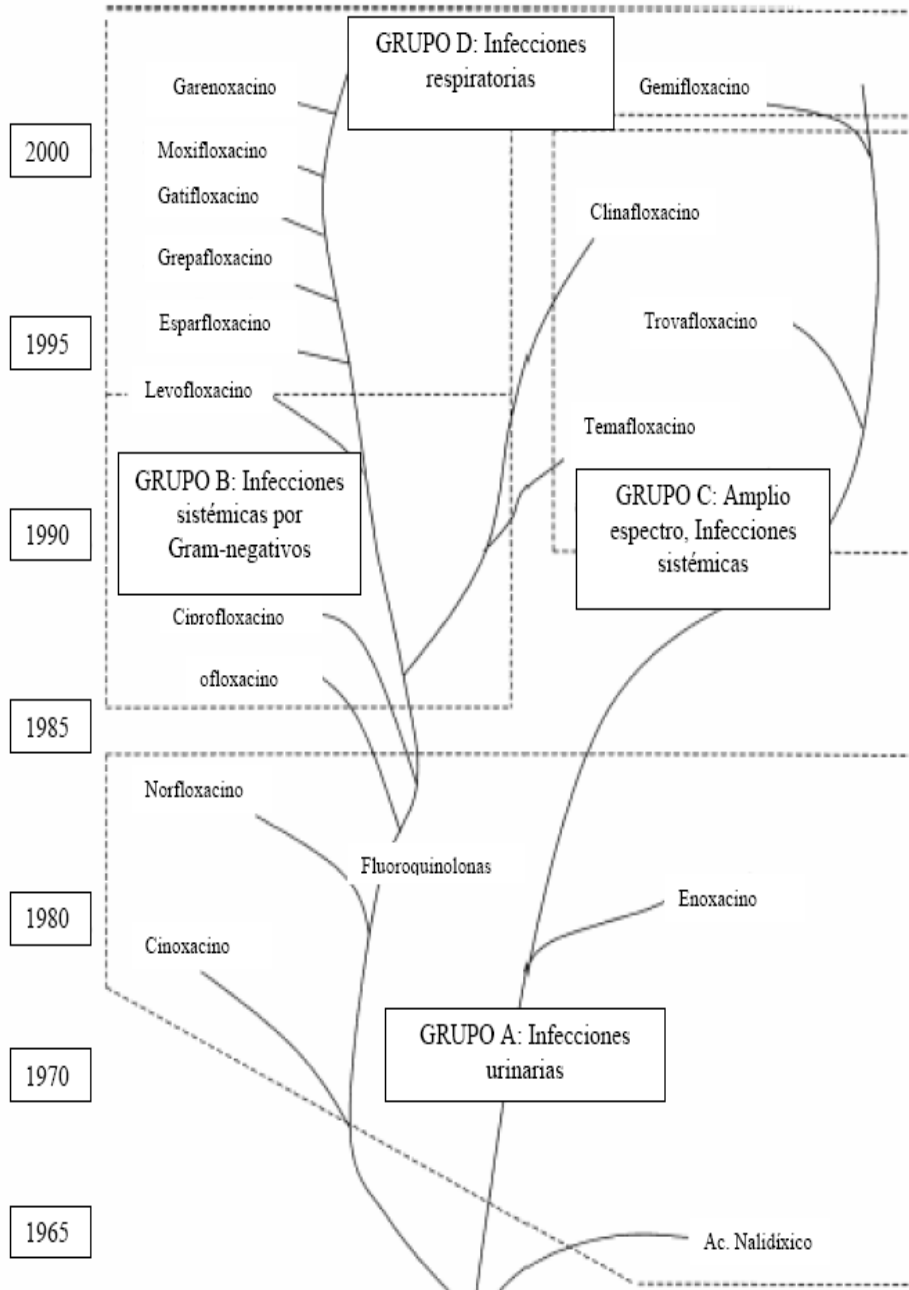


Figura 10.- Relación entre el año de introducción de las quinolonas y su uso en clínica.

Una de sus primeras indicaciones fueron las infecciones urinarias, debido a su actividad frente a enterobacterias, las principales causantes de este tipo de infecciones, así como a que debido a su eliminación por vía renal acumulan grandes concentraciones de antibiótico en el tracto genitourinario. De este modo las quinolonas se usan de manera frecuente para el tratamiento de cistitis, prostatitis o pielonefritis, siendo el norfloxacino la quinolona más comúnmente utilizada, aunque también pueden ser utilizadas el ciprofloxacino o el ofloxacino, entre otras (Oliphant y Green, 2002; Alos, 2003).

Las quinolonas también son efectivas en infecciones gastrointestinales y abdominales. Éstas presentan una muy buena actividad sobre los principales patógenos, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli*, o *Campylobacter* spp. Por este motivo algunos autores proponen el uso de estos antimicrobianos como profilaxis de la llamada “diarrea del viajero” en aquellas personas que se dispongan a viajar a países en vías de desarrollo (Tellier y Keystone, 1992). Otro uso de las quinolonas es como descontaminantes del aparato digestivo en pacientes sometidos a trasplantes con el fin de evitar posteriores infecciones, así como en protocolos de prevención de peritonitis bacteriana espontánea en pacientes cirróticos (Bauer y cols., 2002; Fernández-Mosteirín, 2005).

En la actualidad las quinolonas se utilizan en el tratamiento de infecciones sistémicas graves por su amplio espectro de acción, su administración oral y su tolerabilidad, así como en infecciones óseas que necesitan un tratamiento prolongado (Alos, 2003).

Las quinolonas más modernas se han llegado a utilizar para infecciones respiratorias, especialmente para el tratamiento de la neumonía ya sea nosocomial o adquirida en la comunidad. Los patógenos más comunes causantes de este tipo de infección (especialmente los neumococos) serían susceptibles al tratamiento con estos antibióticos (Alos, 2003). Aunque en los últimos años han empezado a surgir cepas resistentes (Davidson y cols., 2002).

Las quinolonas utilizadas en medicina veterinaria son (Tabla 6) (AGEMED, 2012; EMA, 2012):

FLUOROQUINOLONA	ANIMAL
Ácido oxolínico	Trucha
Danofloxacin	Bóvidos (para carne y/o leche) y cerdos.
Difloxacin	Perros, pollos, pavos y terneros.
Enrofloxacin	Perros, gatos, conejos, pollos, pavos, terneros, caballos y cerdos.
Flumequina	Gallinas, pavos, cerdos, corderos, cabras, terneros, salmón y trucha
Ibafloxacin	Perros y gatos.
Marbofloxacin	Perros, gatos, cerdos y bovino (para carne y/o leche).
Orbifloxacin	Perros y gatos.
Pradofloxacin	Perros y gatos.

Tabla 6. Relación de quinolonas y su utilización en diversas especies animales.

- PORCINO:

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*. Sin embargo, su uso en cerdos está prohibido en Estados Unidos y en otros países (Walker, 2000).

- BOVINO, OVINO Y CAPRINO:

Las fluoroquinolonas son activas frente a microorganismos asociados a infecciones respiratorias agudas en ganado, caprino y ovino, causadas por *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida* y *Haemophilus somnus*. Otras indicaciones pueden ser mastitis, metritis, conjuntivitis e infecciones causadas por *Mycoplasma* spp., como la neumonía y la otitis media. Sin embargo, en Estados Unidos, sólo ha sido aprobado el uso de fluoroquinolonas en neumonía aguda en ganado vacuno (Walker, 2000).

- EQUINO:

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 antibióticos de primera elección en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram negativas en caballos. En la pleuritis crónica causada por *Escherichia coli*, se ha utilizado enrofloxacin con éxito clínico. En estos animales, también ha sido descrita la seguridad y eficacia de orbifloxacin (Walker, 2000; USP Drug information, 2003).

- CANINO Y FELINO:

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 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 un ensayo clínico se estudió la eficacia de rifampicina más ciprofloxacino en el tratamiento de la brucelosis en perros, los resultados pusieron de manifiesto que esta combinación es tan eficaz como el régimen estándar empleado en medicina humana, compuesto por rifampicina y doxiciclina (USP Drug information, 2003).

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).

- AVES:

En las explotaciones de aves de corral, se necesitan agentes antimicrobianos con capacidad bactericida rápida frente a los patógenos que se aíslan frecuentemente, entre los que

destacan *Escherichia coli*, que causa graves septicemias y celulitis, *Salmonella* spp., *Haemophilus paragallinarum* y *Pasteurella multocida*. Sarafloxacino y enrofloxacino 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 *Escherichia coli* en pollos y pavos. Enrofloxacino, además, también ha sido aprobado en el tratamiento de las infecciones causadas por *Pasteurella multocida* en pavos (Walker, 2000; USP Drug information, 2003).

- 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).

Además se ha visto que las fluoroquinolonas son efectivas en el tratamiento de las queratitis oculares en conejo causadas por *Staphylococcus aureus*, con daño tisular e inflamación por la acción de toxinas secretadas por dicho microorganismo. Dajes y cols. (2004) concluyen, en un estudio realizado en conejos, que la eficacia de moxifloxacino en el tratamiento de queratitis causadas por *Staphylococcus aureus* es superior a la encontrada con levofloxacino y ciprofloxacino.

2.12.- TOXICIDAD Y EFECTOS ADVERSOS

Los efectos adversos de las quinolonas, con excepciones, no suelen tener consecuencias graves si los comparamos con los beneficios que tienen (Sárközy, 2001). Igualmente, con algunas excepciones (temafloxacino, trovafloxacino, grepafloxacino), las

fluoroquinolonas se consideran seguras y bien toleradas (Stahlmann, 1990). La toxicidad depende generalmente de la dosis y la especie animal de destino (Bertino y Fish, 2000).

Se han descrito efectos tóxicos de las quinolonas sobre el sistema nervioso, cardiovascular y gastrointestinal del hombre y de los animales, así como condrotoxicidad, toxicidad sobre la reproducción y el desarrollo, genotoxicidad, cardiogénesis y fototoxicidad (Otero y cols., 2001b).

Las fluoroquinolonas son comparables con otras clases de antibióticos en términos de frecuencia y gravedad de los efectos adversos. En estudios clínicos comparativos, la frecuencia global de efectos adversos para diferentes fluoroquinolonas está entre 3-40%. En otros antibióticos: 6-35% en penicilinas, 39% en eritromicina, 12-39% en cefalosporinas, etc. (Wolfson y Hooper, 1991; Norrby, 1991).

Por orden de frecuencia de aparición y órganos afectados clasificamos los efectos adversos en:

- **Efectos adversos gastrointestinales:** son los más comunes. Su prevalencia se estima entre un 2 y un 20% siendo los más frecuentes: náuseas, anorexia y dispepsia. Otros efectos como dolor abdominal, vómitos y diarrea son menos frecuentes pero pueden ser de mayor gravedad (Gobernado y Santos, 2002)
- **Efectos adversos hepáticos:** suelen ocurrir con una frecuencia del 2-3%. Las reacciones más frecuentes son elevación de enzimas hepáticas como alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa y fosfatasa alcalina. También se han dado casos de aumento de la bilirrubina total. Estas elevaciones son leves y reversibles al interrumpir el medicamento. Trovafloxacin es una fluoroquinolona con una hepatotoxicidad conocida clínicamente significativa (Wolfson y Hooper, 1991; Lietman, 1995; Lipsky y Baker, 1999).
- **Efectos adversos en el SNC:** su frecuencia es del 1-2%, llegando incluso al 11% para algunos autores (Stahlmann, 1990; Lipsky y Baker, 1999). Los efectos más frecuentes son: dolor de cabeza, mareos y somnolencia. Otros efectos menos frecuentes que han sido notificados son: inquietud, insomnio, trastornos del sueño, agitación y cambios en la visión. También se han documentado casos puntuales de convulsiones y ataques, siendo más frecuentes en pacientes con factores predisponentes a padecerlas (trauma craneal, anoxia, convulsiones, alteraciones metabólicas, terapia con

medicamentos que interactúan tales como teofilina y antiinflamatorios no esteroideos, etc.) (Stahlmann, 1990; Wolfosn y Hooper, 1991; Lipsky y Baker, 1999). Las fluoroquinolonas que producen más efectos secundarios sobre el SNC y en orden de importancia son: trovafloxacino > norfloxacino > gatifloxacino > moxifloxacino > sparfloxacino > ciprofloxacino > ofloxacino > levofloxacino (Fish, 2001).

- **Efectos adversos renales:** son poco frecuentes, existiendo casos de hematuria, nefritis intersticial e insuficiencia renal aguda (Stahlmann, 1990; Allon y cols., 1990; Domagala, 1994).

La frecuencia de elevación de los niveles de creatinina sérica durante la terapia con fluoroquinolonas es 0,2-1,3%, y la frecuencia de azotemia es similar (Wolfosn y Hooper, 1991; Lietman, 1995).

En animales se han informado casos de cristaluria. Esto es debido a la disminución de la solubilidad de las fluoroquinolonas en pH fisiológico o alcalino. Esta cristaluria aparece excepcionalmente en la orina ácida normal de los seres humanos (Domagala, 1994; Bryskier y Chantot, 1995).

- **Efectos adversos dermatológicos:** se producen entre el 0,5-3% de los casos. El efecto más frecuente es la reacción fototóxica, la cual puede aparecer en apenas unas horas después de la administración de la quinolona y con la suficiente exposición a radiación ultravioleta (UV). Las reacciones de fotosensibilidad requieren exposición previa al agente, aparecen al cabo de 1 o 2 horas y sus manifestaciones clínica van desde un leve eritema en las áreas expuestas al sol hasta erupciones graves, y pueden ser causadas tanto por la exposición directa e indirecta a la luz del sol, como por la exposición a lámparas UV (Domagala, 1994; Lipsky y Baker, 1999). Las reacciones generalmente disminuyen tras suspender la terapia, pero pueden aparecer hasta 3 semanas después de la suspensión del antibiótico. Esto puede ocurrir con aquellas fluoroquinolonas que tienen alta penetración en tejidos o una larga semivida de eliminación (Domagala, 1994). De mayor a menor gravedad de producir fototoxicidad, las fluoroquinolonas se clasifican de la siguiente manera: lomefloxacino > sparfloxacino > ciprofloxacino > norfloxacino > ofloxacino > levofloxacino > trovafloxacino > moxifloxacino > gatifloxacino (Fish, 2001). Otras reacciones adversas dermatológicas poco frecuentes

causadas por fluoroquinolonas son: erupción cutánea, prurito, edema, hiperpigmentación, dermatitis, vasculitis, eritema multiforme y púrpura de Henoch-Schönlein (Fish, 2001).

- **Efectos adversos oculares:** se han descrito casos de daño ocular por el ácido nalidíxico y pefloxacino cuando se han administrado en animales a dosis altas. Las manifestaciones oculares incluyen: cataratas, opacidades lenticulares punteadas, cambios morfológicos de la retina y alteración de la agudeza visual (Schentag y Scully, 1999). Con enrofloxacino a dosis altas en gatos se han descrito en EEUU casos de ceguera (Nota de la EMA).
- **Reacciones de hipersensibilidad:** han sido descritas por el uso de fluoroquinolonas en diferentes estudios clínicos en el 0,6-1,4% de los pacientes. Estas reacciones fueron principalmente: eritema, prurito, urticaria y erupción cutánea, causadas por cualquier reacción alérgica o mediante la liberación de histamina (Stahlmann, 1990). Las reacciones anafilácticas a fluoroquinolonas son raras, con una frecuencia de 0,46-1,2 casos/100000 en la especie humana. Estas reacciones se produjeron a partir de los 5-60 minutos después de la administración de las mismas (Paton y Reeves, 1992).
- **Efectos adversos músculoesqueléticos:** se han descrito casos de artropatías en aproximadamente un 1% de los pacientes tratados con fluoroquinolonas (Hayem y Carbon, 1995). Las manifestaciones más comunes fueron: dolores articulares, rigidez e hinchazón de las articulaciones, especialmente las rodillas. Se han observado durante los primeros días de tratamiento y principalmente en pacientes menores de 30 años. Estos síntomas suelen desaparecer en días o semanas después de la suspensión del fármaco (Fish, 2001). El mecanismo por el que se produce ese daño articular, se sospecha que sea 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). Tendinitis y rupturas espontáneas de tendón han sido descritas en personas, durante o tras una terapia con quinolonas. Pueden ocurrir de manera unilateral o bilateral (Lipsky y Baker, 1999). El riesgo de ruptura del tendón de Aquiles fue 4 veces superior entre las personas que recibieron una fluoroquinolona y las que no la recibieron. Generalmente, aparece en

personas mayores de 50 años y en tratamiento concomitante con corticosteroides (Pierfitte y cols., 1995; Szarfman y cols., 1995). Los síntomas pueden ocurrir dentro de 2-42 días después de iniciar el tratamiento y se suelen resolver dentro de 1-2 meses después de la suspensión del antibiótico (Fish, 2001).

- **Efectos adversos cardiacos:** la administración de fluoroquinolonas, principalmente sparfloxacino y grepafloxacino, se ha asociado con una prolongación en el electrocardiograma del intervalo QT corregido (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*”. Diferentes estudios lo han demostrado en diferentes fluoroquinolonas que producen bloqueo del gen HERG aunque con diferente potencia (Fish, 2001). Otros efectos cardiovasculares adversos asociados con las fluoroquinolonas son: hipotensión o hipertensión, taquicardia, síncope, migraña, edema y dolor en el pecho (Fish, 2001).
- **Efectos adversos hematológicos:** 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 una relación causal. Con excepción de temafloxacino, es raro que se asocie anemia hemolítica con el uso de estos antibacterianos (Fish, 2001).
- **Efectos carcinogénicos y teratogénicos:** se deben a que estas 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, aproximadamente de 300-10000 veces más de las requeridas para los efectos antibacterianos. Se han realizado estudios de toxicología a largo plazo, y no se ha encontrado evidencia de efectos cancerígenos ni daño en el ADN humano después de la exposición

clínica a estos antibióticos (Gootz y cols., 1990; Suto y cols., 1992). En cuanto a los efectos teratogénicos, ha sido descrito pérdida de peso fetal y un aumento de la mortalidad fetal con levofloxacino en ratones, pero no en conejos, 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. Moxifloxacino, a dosis iguales o superiores a la dosis máxima permitida en el hombre, produjo en conejos una pérdida de peso fetal y un retraso en la calcificación esquelética. También se ha registrado una disminución de peso al nacer en monos, a dosis de moxifloxacino 2,5 veces superiores a la máxima dosis recomendada en el hombre (Fish, 2001). Las fluoroquinolonas se clasifican por la FDA en la categoría C en embarazadas. Se han realizado estudios controlados en mujeres embarazadas y se ha concluido que deben utilizarse durante el embarazo sólo si el beneficio supera el riesgo potencial para el feto (Fish, 2001).

2.12.1.- RELACIÓN ENTRE ESTRUCTURA Y EFECTOS ADVERSOS

Cada fluoroquinolona tiende a producir ciertos efectos adversos, diferencias que pueden ser explicadas por las características estructurales (Domagala, 1994). Las alteraciones digestivas y la artropatía no parecen tener relación con las modificaciones químicas de las distintas moléculas. Sin embargo, la cristaluria, las alteraciones neurológicas y la fototoxicidad, sí están muy relacionadas con estas modificaciones (Gutiérrez-Zufiaurre, 2004).

A continuación se detallan los diferentes efectos adversos según las modificaciones en las diferentes posiciones de la estructura básica o núcleo de las quinolonas:

- **Sustituciones en posición 1.**

Los radicales unidos al nitrógeno de esta posición van a influir en la genotoxicidad de las quinolonas. La presencia de un ciclopropilo implica moléculas con mayor citotoxicidad, seguidas de aquellas que presentan un tert-butilo, un 2,4-dihidrofenoilo y un grupo etilo (Lipsky y Barker, 1999).

- **Sustituciones en posición 2 y 6.**

No se han descrito efectos secundarios relacionados con el radical en posición 2 ni con el flúor en posición 6 (Gutiérrez-Zufiaurre, 2004).

- **Sustituciones en posición 3 y 4.**

La localización del grupo carboxilo de la posición 3 y el grupo oxo en posición 4 producen quelación de algunos cationes, tales como Ca^{2+} , Mg^{2+} y Fe^{2+} . Mas que un efecto adverso, lo que se produce es una interacción, de la cual, al final, lo que se obtiene es una disminución de la absorción oral y por tanto fracasos en el tratamiento (Lomaestro y Bailie, 1991).

- **Sustituciones en posición 5.**

Los radicales presentes en esta posición van a afectar en la inducción de fototoxicidad y genotoxicidad. Concretamente, la fototoxicidad se produce cuando la quinolona se excita con luz ultravioleta, la cual, en ocasiones libera radicales libres tóxicos para las células. Aumentan la fototoxicidad los grupos metilo (grefapfloxacino), seguido de un hidrógeno (ciprofloxacino) y grupo amino (sparfloxacino), interviniendo de una manera importante el sustituyente en posición C8 (Domagala, 1994).

- **Sustituciones en posición 7.**

El radical en posición 7 está relacionado con los efectos directos de las quinolonas sobre el SNC, debido a su unión con los receptores gabaérgicos cerebrales, bloqueando la unión del GABA. Los efectos más frecuentes son: cefaleas, alteraciones del ritmo del sueño, alteraciones del humor, vértigo y convulsiones (Wolfosn y Hooper, 1991; Domagala, 1994).

La presencia de moléculas de menor tamaño en C7, tales como piperacinas (ciprofloxacino, norfloxacino) y pirrolidinas (tosufloxacino, clinafloxacino) son las que más antagonizan con el GABA. Estas moléculas sustituidas formarían radicales voluminosos y tendrán menor antagonismo con el GABA (Domagala, 1994; Brysker y Chantot, 1995).

Otros efectos adversos relacionados con las sustituciones en esta posición son:

- Genotoxicidad: el anillo pirrolidinil es más citotóxico que el piperacínil, y éstos más que los anillos con alguna sustitución en su estructura (Gutiérrez-Zufiaurre, 2004).
- Alteraciones dermatológicas: la presencia de un grupo alquilo en el anillo piperacínil en el C7 está relacionado con eritema, urticaria, prurito, erupción (Norrby, 1991).

▪ **Sustituciones en posición 8.**

Los cambios en X8 están relacionados con la producción de genotoxicidad y fundamentalmente con la fototoxicidad (Lipsky y Barker, 1999):

- El radical más genotóxico es C-F, seguido en orden por: C-Cl, C-OCH₃, N, C-CF₃ y C-H.
- La fototoxicidad se ha demostrado en las quinolonas que tienen un grupo halogenado en C8, como el flúor (lomefloxacino, sparfloxacino y fleroxacino). Esta fototoxicidad disminuye con otros radicales como el grupo metoxi.

En orden decreciente de toxicidad en función del radical en esta posición: C-F ≥ C-Cl > N > CH > CF₃ > C-OR.

▪ **Otros efectos adversos relacionados con la estructura.**

Cristaluria y nefrotoxicidad: grupos alquilo en la posición C7 (CF, CCl, CCF₃) como en C8 mejoran la solubilidad en agua. En cambio, radicales con grupos amino favorece la cristaluria (Rosen y cols., 1988).

2.13.- INTERACCIONES

2.13.1.- INTERACCIONES CON MEDICAMENTOS

Las quinolonas, como la mayoría de antimicrobianos, presentan interacciones con otros grupos farmacológicos a distintos niveles y por distintas causas.

Interacciones relacionadas con la estructura.

Algunas interacciones están relacionadas con la estructura de la molécula:

- Los radicales unidos al nitrógeno de la posición 1 van a influir en la interacción con las xantinas. La presencia de radicales pequeños y lineales (ciclopropilo o etilo) aumenta la interacción con las xantinas; sin embargo, si el sustituyente es un fluoroetil (fleroxacino) o un 2,4-difluorofenilo (temafloxacino) disminuye el grado de interacción en un 10-25% en comparación con radical ciclopropilo (Lipsky y Baker, 1999).
- Existen interacciones entre el sustituyente en posición C7 y algunos antiinflamatorios no esteroideos y sus metabolitos. Incluso con ciertas quinolonas esta interacción puede aumentar de 100 a 300 veces. Aquellas fluoroquinolonas que no presentan sustituciones en el anillo piperacínil (como ciprofloxacino, enoxacino y norfloxacino) muestran mayor interacción con los antiinflamatorios no esteroideos, mientras que las que presentan una cadena alquilada en el anillo piperacínil y un anillo pirrodínil muestran una interacción mínima (Lomaestro y Bailie, 1991).

También la posición 7 va a influir en la interacción de las quinolonas con las xantinas. Los radicales pequeños y lineales incrementan esta interacción, mientras que los más voluminosos la disminuyen (Domagala, 1994).

- Los cambios producidos en X8 están relacionados con la interacción con los antiinflamatorios no esteroideos y con las xantinas (aunque en menor medida que los cambios en C7). Los derivados 1,8-naftidironas interfieren más en el metabolismo de las xantinas que aquellos que presentan derivados voluminosos en posición 8 (Gutiérrez-Zufiaurre, 2004).

2.13.2.- INTERACCIONES CON ALIMENTOS

El grado en que las fluoroquinolonas son absorbidas no se ve afectado significativamente por los alimentos. Se han realizado estudios con ciprofloxacino, levofloxacino, gatifloxacino y moxifloxacino, encontrándose alteraciones en el grado de absorción, pero con una tasa neta final sin cambios (Fish, 2001).

Cuando las fluoroquinolonas se administran con los alimentos, el tiempo en alcanzar la concentración máxima ($T_{m\acute{a}x}$) se retrasa, y la concentración plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$) se

reduce un 8-16%. El área bajo la curva (AUC) no se ve modificada, y las alteraciones en los índices de absorción se consideran clínicamente insignificantes (Fish, 2001).

2.13.3.- INTERACCIONES A NIVEL DE LA ABSORCIÓN

La absorción oral de las fluoroquinolonas se ve reducida por la interacción de estas con productos que contienen cationes multivalentes como aluminio, antiácidos que contienen magnesio y productos que contienen calcio, hierro o zinc. Esto es debido a la formación de complejos insolubles mediante quelación, en el tracto gastrointestinal, que disminuyen la absorción. La quelación se produce sobre todo con aluminio y magnesio, si bien todos los productos que contengan cationes reducen la absorción de manera significativa, lo que aumenta la posibilidad de fracaso terapéutico (Fish, 2001).

Los preparados multivitamínicos que contienen minerales producen efectos similares a los anteriores en la absorción de las fluoroquinolonas. Igualmente ocurre con la administración concomitante de fluoroquinolonas con sulfato ferroso, que disminuye la biodisponibilidad de los antibióticos entre un 19-66% (Shiba y cols., 1992).

Para evitar estas interacciones, estos productos se deberán administrar al menos 2 horas antes o 4-6 horas después de la dosis de fluoroquinolona (Shiba y cols., 1992).

La absorción de ciprofloxacino se ve afectada negativamente, con una disminución del 26-29% en plasma de la $C_{máx}$ y del AUC, cuando se administra conjuntamente con didanosina, ya que su formulación está compuesta por carbonato de aluminio e hidróxido de magnesio como tampón. Igualmente, pueden interactuar otras fluoroquinolonas, por lo que su administración concomitante debe evitarse (Knupp y Barbhaiya, 1997).

2.13.4.- INTERACCIONES A NIVEL DEL METABOLISMO

A nivel del metabolismo se han descrito interacciones de las fluoroquinolonas en el aclaramiento de derivados de xantinas, incluyendo teofilina y cafeína. Esta interacción resulta del metabolismo de las fluoroquinolonas por la isoenzima 1A2 del sistema citocromo P450. Las fluoroquinolonas inhiben esta enzima previniendo el metabolismo/inactivación de las metilxantinas como cafeína y teofilina, provocando exceso de estas sustancias en sistema nervioso central y estimulación cardíaca. (Radandt y cols., 1992).

Algunas fluoroquinolonas inhiben ciertas enzimas hepáticas que son utilizadas por la warfarina. Es por ello que su administración concomitante puede producir una disminución en el metabolismo de la warfarina y un aumento de la respuesta terapéutica. Sin embargo,

diversos estudios han demostrado que esta interacción no es clínicamente significativa (Fish, 2001).

Ciprofloxacino y norfloxacino disminuyen el aclaramiento de ciclosporina, aumentando sus concentraciones séricas (McLellan y cols., 1995; Davis y cols., 1996).

Enrofloxacinó a las dosis usuales, inhibe las enzimas hepáticas P450IA1 e IA2, por lo que debe tomarse precaución cuando se administra en forma conjunta con fármacos que utilizan este sistema enzimático, tales como warfarina, fenacetina y fenotiazina (Otero y cols., 2001b).

Existen informes que indican la posible existencia de interacciones entre las fluoroquinolonas y determinados antibióticos contra micobacterias, concretamente rifampicina, pirazinamida y cicloserina. La rifampicina, es un inductor del CYP hepático, aumentando el metabolismo de grepafloxacino y por tanto obteniéndose niveles del mismo subterapéuticos. Pirazinamida y cicloserina interaccionan con ofloxacino produciendo un aumento de la toxicidad a nivel del sistema nervioso central cuando se administra junto con cicloserina y dando lugar a una mala tolerancia cuando se administra con pirazinamida (Fish, 2001).

2.13.5.- INTERACCIONES A NIVEL DE LA EXCRECIÓN

La cimetidina puede inhibir la secreción tubular renal, y por tanto, reducir el aclaramiento sistémico de fluoroquinolonas que se excreten principalmente por vía renal (levofloxacino, ciprofloxacino, lomefloxacino, sparfloxacino, gatifloxacino) (Fish, 2001).

El probenecid puede inhibir, al igual que cimetidina, la secreción tubular renal de las fluoroquinolonas eliminadas principalmente por excreción renal (Aminimanizani y cols., 2001).

2.13.6.- OTRAS INTERACCIONES

Una de las interacciones más importantes de las quinolonas se presenta con fármacos como la warfarina y la digoxina. Estos no deberían asociarse con las fluoroquinolonas que prolongan el intervalo QT, por la posible aparición de arritmias y/o problemas cardiacos (Bertino y Fish, 2000).

Para minimizar el riesgo de prolongación del intervalo QT y arritmias, las fluoroquinolonas no deben co-administrarse con fármacos que prolonguen dicho intervalo, como eritromicina, disopiramida o antidepresivos como amitriptilina (Owens y Ambrose, 2002; Owens y Ambrose, 2002b; Curtis y cols., 2003).

La administración de determinadas quinolonas, como enoxacino, ha dado casos de convulsiones al asociarse con fenbufeno (Christ, 1990). El mecanismo parece ser la potenciación por los antiinflamatorios no esteroideos de la inhibición competitiva de los receptores GABA por las fluoroquinolonas (Radandt y cols., 1992). Los estudios en humanos no han encontrado evidencia significativa de interacción entre fenbufeno y ciprofloxacino (Kamali y cols., 1998). Es por ello, que no parece que exista interacción clínicamente significativa entre antiinflamatorios no esteroideos y las nuevas fluoroquinolonas (Fish, 2001).

La administración de ciprofloxacino con foscavir ha dado lugar a un aumento de la frecuencia de convulsiones, por un mecanismo mediado por receptores GABA (Matsuo y cols., 1998).

Las fluoroquinolonas se antagonizan con macrólidos y tetraciclinas frente a estreptococos y enterococos y en general antagonizan también al cloramfenicol (Otero y cols., 2001b).

Ciprofloxacino se ha asociado con un aumento de las concentraciones en suero de fenitoína cuando se administraron conjuntamente, existiendo evidencia clínica de toxicidad (Davis y cols., 1996).

2.14.- PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS

Las variables farmacocinéticas describen los procesos de absorción, distribución metabolismo y eliminación de los fármacos después de su administración. Las fluoroquinolonas en el ámbito veterinario suelen administrarse vía oral en la mayoría de los casos, pero también existe la posibilidad de administrarlas vía parenteral.

La biodisponibilidad de las fluoroquinolonas suele ser alta cuando se administran vía oral (a excepción de los equinos) y casi completa cuando la administración es parenteral (Fitton, A. 1992). Generalmente presentan amplia distribución tisular (incluyendo fagocitos), gran volumen de distribución (2 a 4 litros/kg e incluso más) y unas semividas de eliminación relativamente largas. Su eliminación es fundamentalmente por excreción renal y su metabolismo es hepático (Brown, 1996).

Particularmente importantes son las propiedades fisicoquímicas de un fármaco, que de forma general, condicionan la farmacocinética del mismo, así como la elección de la dosis de

un antibiótico, sobre todo cuando se presentan alguno de estos procesos (Martínez y cols., 2006):

- Función renal y/o hepática alterada. En este caso el aclaramiento puede estar comprometido y provocar un aumento de la concentración sérica del medicamento, afectando a la seguridad del mismo.
- Infección asociada a un absceso purulento o zona de difícil acceso para el antibiótico.
- La infección está producida por una bacteria de sensibilidad desconocida o el patógeno es clasificado como intermedio por los criterios del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).
- La infección está causada por una cepa bacteriana altamente virulenta o tiene su función inmune comprometida (p.e.: animales con edad avanzada, animales tratados con corticoides).
- Las condiciones de administración afectan a la biodisponibilidad del fármaco y por tanto a sus niveles sistémicos alcanzados.
- El uso concomitante de otro fármaco puede dar lugar a interacciones.
- Si queremos limitar la probabilidad de aparición de resistencias.

2.14.1.- ABSORCIÓN Y BIODISPONIBILIDAD

La absorción de las fluoroquinolonas se lleva a cabo en el tracto digestivo superior, fundamentalmente en duodeno y en menor proporción en yeyuno.

Su biodisponibilidad oral puede variar entre el 50 % y el 90 % dependiendo de la especie animal que se trate y de la molécula considerada (Fitton, A., 1992). Pero a pesar de esta variabilidad, las fluoroquinolonas se absorben rápidamente tras su administración oral en animales de estómago monocavitario. No es así en el caso de los ruminantes, donde las concentraciones sistémicas alcanzadas tras la administración por esta vía están por debajo de los niveles terapéuticos.

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 ibafloxacinó junto con alimentos, se produce un incremento del AUC y $C_{m\acute{a}x}$ en gatos (Coulet y cols., 2005).

La naturaleza lipófila de estas moléculas favorece su absorción por difusión pasiva. También se han demostrado la existencia de transportadores en la membrana apical para esparfloxacinó, levofloxacinó, ciprofloxacino y norfloxacino (Griffiths y cols., 1994; Rabbaa y cols., 1997). Para que la absorción a lo largo del intestino sea completa, el fármaco debe estar totalmente disuelto. En caso contrario, la biodisponibilidad oral sería pobre y las concentraciones séricas inferiores a las esperadas. Cuando se trate de moléculas absorbidas por transportador, puede ocurrir que haya una saturación de los mismos o un proceso de competición por otras moléculas, entonces la biodisponibilidad oral también disminuiría (Griffiths y cols., 1994).

Los transportadores juegan otro papel importante en el mecanismo de eliminación de quinolonas. Llevan a cabo un proceso activo de secreción del fármaco desde la sangre a la luz intestinal, con gasto energético asociado. Es el caso de ciprofloxacino, norfloxacino y perfloxacino, que sufren este mecanismo de eliminación (Dautrey y cols., 1999; Griffiths y cols., 1994). Además, esta secreción intestinal puede llevarse a cabo por diferentes transportadores para diferentes fluoroquinolonas, por ejemplo, el esparfloxacinó es un substrato de la P-glicoproteína y el ciprofloxacino puede ser mediado por transportadores catiónicos y/o aniónicos orgánicos (Dautrey y cols., 1999).

2.14.2.- DISTRIBUCIÓN

Las fluoroquinolonas poseen, en general, amplios volúmenes de distribución, mayores incluso que los que presentan antibióticos como los betalactámicos o aminoglucósidos. Se pueden alcanzar volúmenes de distribución mayores de 1,0 L/kg (Lode y cols., 1998; Aminimanizani y cols., 2001). Para interpretar correctamente este valor es necesario 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 0,5 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 antibiótico intersticial libre, se ha confirmado que esta concentración es comparable a la concentración del fármaco libre en plasma venoso (Araki y cols., 1997). Por tanto, excluyendo las situaciones asociadas a la captación iónica, desde que se establece el equilibrio entre la sangre y la concentración de fármaco libre en 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).

Las fluoroquinolonas presentan, en general, una tasa de unión a las proteínas plasmáticas variable, entre un 10 % y un 60 %, pero ésta es relativamente baja si se compara con el 90% de unión del ácido nalidíxico (Fitton, A., 1992). Entre las proteínas séricas, las quinolonas se unen principalmente a la albúmina (Okazaki y col., 1991). La unión varía, dependiendo de la estructura química de la fluoroquinolonas y de la especie estudiada, debido principalmente a la diferente afinidad del fármaco por las respectivas albúminas (Bregante y col., 2000).

El danofloxacino presenta una unión a proteínas plasmáticas que oscila desde el 10 % al 49%, dependiendo de la especie animal que se trate. Por ejemplo: la cabra presenta un 13% de unión a proteínas plasmáticas, 44% en el cerdo y entre el 10 y el 49% en las vacas. Moxifloxacino es la fluoroquinolona que presenta un mayor porcentaje de unión a proteínas plasmáticas, superior en todas las especies al 60 % (Bregante y col., 2000).

La actividad *in vivo* de un agente antimicrobiano, debida a la capacidad del fármaco para pasar de la sangre a los tejidos, depende de la fracción libre de dicho fármaco. La existencia de barreras puede dificultar la difusión de un antibiótico 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 hematoencefálica 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 antibiótico y su capacidad para difundirse en tejidos a través de las barreras biológicas, ayudará a los clínicos a definir una apropiada pauta terapéutica (Martínez y cols., 2006).

Se han determinado altas concentraciones de fluoroquinolonas en saliva y secreción nasal, en mucosa, epitelio y secreción bronquial, así como en el hígado y en el tracto urinario

(Vancutsem y cols., 1990; Brown, 1996). Además penetran bien en el tejido pulmonar, fluido de revestimiento y macrófagos alveolares, incluso alcanzándose concentraciones mayores a las plasmáticas (Wise, 1991). Las fluoroquinolonas penetran y alcanzan concentraciones intracelulares muy elevadas tanto en las células fagocíticas como en las no fagocíticas, y por tanto poseen una gran actividad intracelular frente a un amplio rango de microorganismos (Brown, 1996; Pascual y García, 1998). En la bibliografía también se referencia el paso rápido de las quinolonas a leche (Sumano y cols, 1993).

2.14.3.- METABOLISMO Y EXCRECIÓN

La eliminación de las quinolonas es principalmente por metabolismo hepático y excreción renal, siendo en este caso por filtración glomerular o secreción tubular activa. Por lo general, se metabolizan en el hígado y se excretan en bilis y orina a altas concentraciones de fármaco activo (fármaco inalterado o metabolito activo) (Neer, 1988).

La mayoría de los metabolitos primarios de las fluoroquinolonas son activos, sin embargo, estos metabolitos tienen en general una semivida de eliminación más corta que el compuesto original.

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

- Vía renal: enrofloxacino, orbifloxacino, ofloxacino, temafloxacino y lomefloxacino.
- Vía hepática: difloxacino y perfloxacino.
- Vía renal y hepático: marbofloxacino, danofloxacino, norfloxacino y ciprofloxacino.

A nivel renal se debe tener en cuenta que según las características físico-químicas de cada quinolona, variará la reabsorción tubular. Los compuestos menos polares, como el pefloxacino o el difloxacino, serán ampliamente reabsorbidos y exhibirán una semivida de eliminación ($t_{1/2\lambda z}$) prolongada. Los compuestos más polares, como el norfloxacino, ciprofloxacino y enoxacino, presentarán valores más altos de aclaramiento renal (Cl), dando lugar a un acortamiento de la semivida de eliminación (Fitton, A., 1992). Los derivados N4 metilados, que son más lipofílicos, son los más susceptibles de ser reabsorbidos (Sörgel y

Kinzig, 1993). La extensión y tipo de metabolismo dependen de cada compuesto en particular.

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 (Vancutsem y cols., 1990; Greene y Budsberg, 1993). El metabolismo hepático de estos antibióticos incluye reacciones de glucuronidación (moxifloxacino, grepafloxacino, cinafloxacino y esparfloxacino), N-oxidación y desmetilación (levofloxacino), y se lleva a cabo principalmente por el sistema del citocromo P450 (Bergogne-Berezin, 2002). Otros mecanismos comunes son: desalquilación, sulfoxidación, acetilación y ruptura del anillo piperazínico (Vancutsem y cols., 1990; Brown, 1996).

Estas reacciones de biotransformación afectan sobre todo al grupo piperazínico y sus sustituyentes (Neuman, M., 1988).

La excreción biliar de algunas fluoroquinolonas, como la pefloxacino, la trovafloxacino o la grepafloxacino puede ser considerablemente alta, por lo que son más adecuadas para el tratamiento de infecciones del tracto biliar (Brown, S.A., 1996; Sasabe y col., 1999).

Las quinolonas también pueden verse afectadas por la secreción activa a través de la membrana intestinal. Las concentraciones intestinales de estos antibióticos pueden variar en función de la secreción biliar y la existencia del ciclo enterohepático, que puede incrementar el tiempo de residencia de estos fármacos en el organismo.

El porcentaje de eliminación a través de la bilis varía entre las especies (Vancutsem y cols., 1990). La eliminación transepitelial a través de la pared gastrointestinal genera altas concentraciones en sitios de colonización de bacterias patógenas, e indudablemente contribuye a la alta eficacia de estos antimicrobianos en las enteritis bacterianas (McKellar, 1996).

2.14.4.- DIFERENCIAS INTERESPECÍFICAS

Existen importantes diferencias ínterespecíficas farmacocinéticas entre las distintas fluoroquinolonas. Cuando comparamos los resultados de aclaramiento de danofloxacino, en cabras y ovejas, tras su administración intravenosa. El aclaramiento en cabras (0,99 L/kg/h) es superior al descrito en ovejas (0,79 L/kg/h), si bien la semivida en ovejas (3,27 h) es inferior a la hallada en cabras (5,46 h) (Escudero y cols., 2007).

Otro ejemplo claro es el caso del aclaramiento (Cl) de difloxacino en cerdos (0,16 L/kg/h). Es substancialmente menor que en pollos (0,72 L/kg/h), sin embargo, en pollos encontramos un volumen de distribución ($V_{ss} = 3,06$ L/kg) mayor que cerdos ($V_{ss} = 1,7$ L/kg). Consecuencia de este mayor aclaramiento, la semivida en pollos (4,1 h) tras una administración intravenosa es más corta que la de cerdos (7,92 h). Tras la administración oral, la biodisponibilidad fue similar en ambas especies ($F_{cerdos} = 93,7\%$; $F_{pollos} = 86,9\%$) (Inui y cols., 1998).

Cox y cols. (2004), analizaron las relaciones alométricas para 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:

$$Cl = 20,6 \text{ (mL/min)} \times PC^{0,815} \text{ (peso corporal), } r = 0,95$$

$$V_{ss} = 3,5 \text{ (L)} \times PC^{0,947} \text{ (peso corporal), } r = 0,93$$

En el mismo estudio, Cox y sus colaboradores examinaron también las relaciones alométricas para enrofloxacino. El gráfico resultante de la representación de log PC 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 estas relaciones alométricas para Cl y V_{ss} . Particularmente, pueden ocurrir grandes errores de extrapolación cuando intentamos predecir parámetros farmacocinéticos en grandes especies como el caballo y el ternero. También hay numerosos casos en que ecuaciones con bajos valores de r predicen extrapolaciones de forma altamente precisa para especies animales desconocidas (Mahmood, 2001).

En la Tabla 7 se muestran diferentes valores de semividas ($T_{1/2,z}$) y biodisponibilidad (F), para diferentes fluoroquinolonas (Mann y Frame, 1992; Greene y Budsberg, 1993; McKellar y cols., 1998; Siefert y cols., 1999; Waxman y cols., 2001; Lees y AliAbadi, 2002b; Carretero y cols., 2002; Fernández-Varón y cols., 2006b; Fernández-Varón y cols., 2006c; Marín y cols., 2007c; Fernández-Varón y cols., 2007d; Marín y cols., 2007d).

	ENROFLOXACINO		DANOFLOXACINO		MARBOFLOXACINO		DIFLOXACINO	
	F (VO) (%)	T1/2 (h)	F (IM) (%)	T1/2 (h)	F (IM) (%)	T1/2 (h)	F (IM) (%)	T1/2 (h)
Pollo	101	15,6	-	-	-	-	-	-
Pavo	61	3,9	-	-	-	-	-	-
Ternero	8	15,4	78	2,9	100	4,2	-	-
Cerdo	-	-	76	6,8	-	-	-	-
Oveja	-	-	95,7	3,35	-	-	99,9	13,9
Perro	91	4,9	-	-	-	8,6	-	-
Caballo	60	5,6	88,5	5,36	88	4,7	95,8	5,72
Cabra	-	-	-	-	100	7,2	106,7	10,4
Conejo	-	-	102,3	6,7	-	-	-	-

Tabla 7.- Comparación de la biodisponibilidad y semividas de eliminación de enrofloxaxino, danofloxacinoy marbofloxacino en diferentes especies animales.

2.14.5.- DIFUSIÓN DE LAS QUINOLONAS A LA LECHE

La mastitis es uno de los problemas de salud más comunes que afectan a las ovejas y a las cabras. Una enfermedad con gran impacto económico negativo en la industria ovina, ya que puede reducir la producción de leche hasta un 58%, generando pérdidas para el ganadero. Además los casos más severos pueden llegar a producir la muerte del animal.

Generalmente las fluoroquinolonas se distribuyen ampliamente en la ubre, aunque su disposición depende de la especie animal. 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).

El danofloxacin en ovejas pasa amplia y rápidamente desde la sangre a la leche, tanto tras la administración intravenosa, como intramuscular, consiguiéndose concentraciones en leche que exceden a las concentraciones séricas ya desde los 60-90 minutos de la administración intravenosa y 90-120 minutos después de la administración intramuscular (para ovejas y vacas, respectivamente) (Shem-Tov y col., 1997b-1998).

2.15.- DANOFLOXACINO

2.15.1.- ESTRUCTURA QUÍMICA Y RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

El ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-[(1S,4S)-5-metil-2,5-diazabicyclo[2.2.1]hept-2-il]-4-oxo-3-quinolincarboxílico, o lo que es lo mismo, el danofloxacin (Figura 11), es un polvo cristalino blanco, ligeramente amarillento. Es una nueva fluoroquinolona sintética desarrollada específicamente para uso veterinario, con actividad de amplio espectro frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas y micoplasma

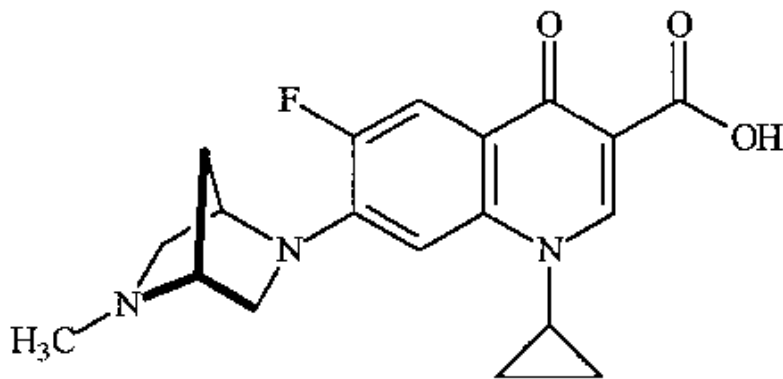


Figura 11.- Estructura química de danofloxacin.

Es una molécula mejorada precursora de una nueva clase de compuestos terapéuticos útiles con dos particularidades: un átomo de flúor en posición 6 que mejora la unión a la DNA-girasa bacteriana y hace que su penetración celular sea hasta 70 veces superior a las quinolonas que no poseen este flúor (Sumano, 1993), y en posición 7, un ciclo alifático diamino (tipo piperazina, metilpiperazina o 3-aminopirrolidina) que le confiere mayor

potencia al tratarse de un anillo voluminoso, al contrario que les ocurre a las quinolonas que tienen en ésta posición moléculas lineales. Además también se ha comprobado que las posiciones 1 y 4 no sustituidas del biciclo, presentan mayor actividad que aquellas moléculas con sustituyentes en dichas posiciones (McGuirk Pr, Jefson MR, 1992).

2.15.2.- PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

Danofloxacino tiene un bajo peso molecular por lo que se ve favorecida su penetración en los tejidos (Otero y cols., 2001a). Sus constantes de ionización son de 6.07 para el grupo del ácido carboxílico en posición 3 y 8.56 para el grupo básico en posición 7 (Martinez y cols 2006). Al entender la relación ente pKa, pH y la difusión del fármaco, sabemos que los fármacos ionizados son atrapados en el lugar de la infección, dando lugar a una alta concentración del mismo en el tejido en comparación con la sangre (Martínez y cols., 2006). Además, danofloxacino se absorbe rápidamente desde el sitio de inyección y presenta un elevado volumen de distribución, lo que indica una amplia distribución en los tejidos. Presenta una alta solubilidad lipídica, baja unión a proteínas y es dependiente de transportadores de flujo dependientes de ATP (Escudero y cols., 2007).

2.15.3.- ESPECTRO ANTIBACTERIANO

El danofloxaciono tiene un amplio espectro como antimicrobiano. Tiene efecto sobre la mayoría de las bacterias Gram negativas y algunas bacterias Gram positivas, micoplasmas y patógenos intracelulares, tales como *Brucella* y especies de *Chlamydia*, pero tiene poca actividad frente a anaerobios. Danofloxacino presenta actividad *in vivo* frente a gérmenes patógenos que se asocian normalmente con las enfermedades respiratorias y entéricas, incluyendo *Escherichia coli*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella Multocida* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*. También muestra actividad *in vitro* frente a otras bacterias Gram negativas (como *Haemophilus somni*), micoplasmas y algunas bacterias Gram positivas. (Ficha técnica AEMPS de Advocin solución inyectable®, 2008 y Advocin 180®,2009)

En la Tabla 8 se muestran los rangos de CMI₉₀ para microorganismos sensibles. (Hannan y cols., 1997; Geornaras y von Holy, 2001; Yoshimura y cols., 2002; Grobbel y cols., 2007, Gharaibeh y cols., 2010; Ozawa y cols. 2010)

MICROORGANISMOS	CMI ₅₀ µg/mL	CMI ₉₀ µg/mL	RANGO CMI µg/mL
<i>Pasteurella haemolytica</i>		0.125	0.03-2
<i>Pasteurella multocida</i>		0.06	≤0.008-0.25
<i>Haemophilus sonnus</i>		0.06	0.03-0.06
<i>Escherichia coli</i>	0.25 ≤0.125	16 ≤0.125	≤0.03-256 ≤0.125-1
<i>Mycoplasma</i>			
<i>M. gallisepticum</i>	0.05	0.1	0.01-0.5
<i>M. synoviae</i>	0.25	0.5	0.1-0.5
<i>M. iowae</i>	0.025	0.5	0.01-1
<i>M. hypopneumoniae</i>	0.025	0.05	0.01-0.05
<i>M. hyosynoviae</i>	0.25	0.25	0.1-0.5
<i>M. hyorhinis</i>	0.5	1	0.25-1
<i>M. bovis</i>	0.25	0.5	0.1-2.5
<i>M. agalactiae</i>	0.25	0.5	0.05-2.5
<i>M. dispar</i>		0.02	
ANAEROBIOS			
<i>Clostridium perfringes</i>	4	128	≤0.125 - ≥256
<i>Actinobacillus pleropneumoniae</i>	≤0.05	≤0.05	≤0.05-0.2
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.25 0.12	2	≤0.125-2 0.016-4.0
<i>Listeria</i>			
<i>L. innocua</i>	2	2	NR
<i>L. monocytogenes</i>	2	2	1-4
<i>Salmonella</i>			
<i>Salm. agona</i>	0.25	0.25	≤0.125-0.25
<i>Salm. blockley</i>	≤0.125	≤0.125	NR
<i>Salm. isangi</i>	≤0.125	≤0.125	NR
<i>Salm. reading</i>	≤0.125	≤0.125	NR
<i>Salm. typhimurium</i>	≤0.125	≤0.125	NR
<i>Staphylococco coagulasa -</i>	0.12		0.06-1.0
<i>Bordetella. bronchiseptica</i>	0.5		0.12-0.5
<i>Streptococco</i>			
<i>S. dysgalactiae</i>	0.5		0.5-1.0
<i>S. uberis</i>	0.5		0.25-1.0

NR: No hay rango. Mismo CMI para todas las cepas

Tabla 8.- Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI₅₀ y CMI₉₀ µg/mL) y rango de concentraciones de danofloxacino para algunos microorganismos.

2.15.4.- ACTIVIDAD DE DANOFLOXACINO EN DIFERENTES ESPECIES ANIMALES

- OVINO:

Han sido varios los estudios realizados tanto *in-vivo* como *in-vitro* de la actividad de danofloxacino en el ganado ovino. Por ejemplo, en un modelo experimental, se administró danofloxacino a corderos con neumonía inducida por *Mannheimia haemolytica*, en dosis única de 6 mg/kg por inyección subcutánea. Los animales presentaron una recuperación de la infección bacteriana, mejora de la patología pulmonar y signos respiratorios respecto de aquellos a los que se les administró suero fisiológico (Godinho y cols. 2007). Otro estudio *in-vitro*, evaluó la eficacia de danofloxacino y otros once antimicrobianos contra *Escherichia coli* enterotoxigénica y *Salmonella spp.* de origen ovino. Las conclusiones obtenidas fueron que danofloxacino fue efectivo a bajas dosis e inhibió el crecimiento bacteriano en comparación con otros antibióticos (Holck T., Perez Martinez J., Raemdonck D., 1993). También se ha comprobado que su uso es efectivo en el tratamiento de infecciones mamarias de cabras y ovejas, debido a las elevadas concentraciones obtenidas en la leche (Escudero y cols., 2007).

- BOVINO:

Danofloxacino ha demostrado ser eficaz en infecciones respiratorias, enteritis, metritis y onfalitis del ganado bovino. Entre los microorganismos causantes de dichas enfermedades y sensibles a danofloxacino: *Bacillus spp.*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Micrococcus luteus*, *Pasteurella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus spp* y *Streptococcus spp* (Caproni Jr. y cols., 2002). Otros estudios han demostrado la eficacia de danofloxacino en el tratamiento de diarreas producidas por *Escherichia coli* en terneros (Sunderland y cols., 2003) e infecciones respiratorias causadas por *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* y *Haemophilus somnus* (Rowan y cols. 2004).

La respuesta clínica con danofloxacino fue superior a la obtenida con Sulfametoxazol/trimetropin y oxitetraciclina para el tratamiento de neumonías en terneros y vacas. (Grimshaw y cols., 1990; Giles y cols., 1991). Además presentó, junto con enrofloxacino, menores porcentajes de resistencia frente a cepas de *Mannheimia haemolytica* (Katsuda y cols., 2009).

En la mastitis bovina inducida con cepas de *Escherichia coli*, danofloxacino mostró ser eficaz en la recuperación de síntomas clínicos y productividad de la leche. (Poutrel y cols., 2008).

- CAPRINO

Danofloxacino fue eficaz en el tratamiento de la pleuropneumonia caprina contagiosa causada por *Mycoplasma capricolum*, así como en la reducción de las lesiones pulmonares (Ozdemir y cols., 2006).

- PORCINO:

Danofloxacino mostró una potente actividad frente a distintas cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* y *Salmonella choleraesuis* que tenían amplio espectro de resistencias frente a otros antibióticos. Se obtuvieron CMI90 menores respecto del resto de antibióticos testados y fueron 0.125, 0.06 y 0.125 µg/ml, respectivamente (Raemdonck y cols., 1994). Posteriormente, Kim y cols obtuvieron una CMI90 de 2 µg/ml para *Actinobacillus pleuropneumoniae* en un estudio realizado en cerdos con neumonia (Kim y cols., 2001) y también demostró ser uno de los agentes mas activos frente a cepas de *Erysipelothrix rhusiopathiae* aisladas de cerdos con erisipela, con CMIs entre 0,1- 0,39 µg/ml (Yamamoto y cols., 2000).

Danofloxacino se distribuye bien por todo el tracto gastrointestinal en cerdos infectados con *Salmonella typhimurium*, pudiendo resultar eficaz en el tratamiento para dichas infecciones (Lindercrona y cols., 2000).

- CANINO:

En un estudio realizado en perros con infección del tracto urinario, se testó la susceptibilidad del danofloxacino a las cepas aisladas en orina, siendo sensibles aproximadamente el 51% de ellas (Çetin y cols., 2003).

- FELINO:

La administración de danofloxacino en gatos domésticos con infección experimental por *Babesia felis* no tubo ningún efecto significativo, por lo que no es adecuado su uso para este tipo de infecciones (Penzhorn y cols., 2000).

- AVES:

La eficacia de danofloxacino fue testada in-vitro y demostró tener una potencia considerable frente a cepas de *Escherichia coli* y *Pasteurella multocida* aisladas de aves de corral, que presentaron una extensa resistencia a otros antimicrobianos. Se obtubieron CMI90 de 0.25 µg/ml respecto de ambos patógenos (Raemdonck y cols.,1992).

Un estudio más amplio, analizó la susceptibilidad de danofloxacino frente a los siguientes patógenos asociados a infecciones aviarias: *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes* y varios serotipos de *Salmonella* (*Salm. agona*, *Salm. blockley*, *Salm. enteritidis*, *Salm. isangi*, *Salm. reading* y *Salm. typhimurium*). Resultó ser un agente activo con CMI90 que no excedían de 0.25 y 2 µg/ml para bacterias Gram negativas y Gram positivas, respectivamente (Geornaras e Ivon Holy ,2001).

También presenta actividad in vitro frente a cepas de *Mycoplasma* causantes de enfermedades respiratorias y de otras localizaciones en vacas, cerdos y aves de corral (Cooper y cols., 1993). Su actividad es similar a enrofloxacino con CMI90 observadas de 0.05 a 1.0 µg/ml en pollos (Hannan y cols. 1997). En el caso de *Mycoplasma gallisepticum*, fue superior a tilosina y con menores lesiones en los sacos aéreos (Kempf y cols., 1992, Tanner y cols., 1993, Migaki y cols., 1993).

En cuanto a la comparación con otras fluoroquinolonas, danofloxacino mostró menor eficacia que enrofloxacino, pero mayor que sarafloxacino en la colisepticemia aviar causada por *Escherichia coli* (Charleston y cols., 1998). Otros autores, sin embargo, muestran actividades similares in vitro a enrofloxacino, norfloxacino y ofloxacino (Ozawa y cols., 2010).

Todas las cepas de *Arcobacter butzleri* aisladas en pollos fueron sensibles al fármaco (Atabay y Aydin, 2001).

En lo que respecta a las resistencias en aves de corral, por el momento no se ha detectado ningún caso de resistencia frente a *Salmonella enteritidis*, en comparación con otros antibióticos beta-lactámicos, tetraciclinas, kanamicina, lincomicina, cloramfenicol, furazolidona (Morshed y Peighambari 2010). Sin embargo, sí presenta una alta tasa de resistencias frente *Enterococcus faecalis*, microorganismo que causa artropatías en pollos (Ciftci y cols. 2009).

- CONEJOS:

Danofloxacino mostró ser efectivo frente a todas las cepas aisladas de *Pasteurella multocida* en infecciones del tracto respiratorio superior en conejos. En el caso de *Bordetella bronchiseptica* y algunas cepas de *Staphilococcus spp.*, se observó una sensibilidad variable (Rouger y cols. 2006). Por el contrario, el 80% de las cepas de *Staphylococcus aureus* testadas frente a danofloxacino, presentaron una CMI < 1 µg/ml.

Debido al bajo índice AUC/CMI obtenido al administrar danofloxacino por vía subcutánea e intramuscular a conejos, no se recomienda su administración por estas vías ya que condiciona la posible selección de cepas resistentes (Férrnandez-Varón y cols., 2007).

2.15.5- INDICACIONES CLINICAS.

2.15.5.1- INDICACIONES APROBADAS POR LA AGENCIA ESPAÑOLA DEL MEDICAMENTO Y PRODUCTOS SANITARIOS

Según la ficha técnica, danofloxacino solución inyectable en las presentaciones de 25 mg/ml y 180 mg/mL, está autorizado por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitario (AEMPS) para las siguientes indicaciones (Ficha técnica de Advocin solución inyectable 25 mg/ml ® y Advocin 180®, AEMPS 2013 y 2009, respectivamente):

A) Advocin solución inyectable 25 mg/ml ®:

- Especies de destino: Porcino y bovino, incluyendo vacas lecheras en lactación.
- Indicaciones de uso: tratamiento de las enfermedades respiratorias en bóvidos causadas por *Pasteurella haemolytica* y *Pasteurella multocida* y tratamiento de las infecciones entéricas provocadas por *Escherichia coli* en bóvidos. Tratamiento de las enfermedades respiratorias causadas por *Pasteurella multocida* y *Actinobacillus pleuropneumoniae* y tratamiento de las infecciones entéricas provocadas por *Escherichia coli* en porcino.

B) Advocin solución inyectable 180 mg/ml ®:

- Especies de destino: Bovino

- Indicaciones de uso: en el bovino, tratamiento de la enfermedad respiratoria bovina provocada por *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* e *Histophilus somni* sensibles a danofloxacino. Tratamiento de la mastitis aguda bovina causada por *Escherichia coli*, sensible a Danofloxacino. En terneros neonatos: tratamiento de infecciones entéricas provocadas por *Escherichia coli* sensible a danofloxacino.

2.15.5.2.- INDICACIONES CLÍNICAS APROBADAS POR LA FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA)

La Food and Drug Administration (FDA), autoriza en animales el uso de danofloxacino 180 mg/ml en las siguientes condiciones (Ficha técnica Advocin® 180 mg/ml FDA)

- Especies de destino: Bovino, (excluyendo terneros).
- Indicaciones de uso: Tratamiento de enfermedad respiratoria bovina asociada a *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* y *Pasteurella multocida* en bóvidos.

2.15.6.- POSOLOGÍA, FORMA DE ADMINISTRACIÓN Y DURACIÓN DEL TRATAMIENTO

Según la ficha técnica del medicamento de la AEMPS, la posología, forma de administración y duración del tratamiento de danofloxacino es:

A) Advocin solución inyectable 25 mg/ml ®:

En bovino puede administrarse por vía intramuscular, o intravenosa a la dosis de 1,25 mg de danofloxacino por kg de peso vivo (1 ml por cada 20 kg de peso vivo). Se precisan tres tratamientos con 24 horas de intervalo entre sí. El tratamiento puede ampliarse por un periodo adicional de dos días, en los animales que no se hayan recuperado plenamente después de los tres días de tratamiento inicial. Para el tratamiento de bóvidos que pesen más de 400 kg, la dosis debe dividirse de manera que no se administren más de 20 ml en un mismo punto de aplicación.

En porcino, se administrará por vía intramuscular a la dosis de 1,25 mg de danofloxacino por kg de peso vivo (1 ml por cada 20 kg de peso vivo). Se precisan tres tratamientos con 24 horas de intervalo entre sí. Para el tratamiento de cerdos que pesen más de 100 kg, la dosis debe dividirse de manera que no se administren más de 5 ml en un mismo punto de aplicación.

B) Advocin solución inyectable 180 mg/ml ®:

6 mg/kg de peso corporal (1 ml/30 kg de peso corporal) en inyección única por vía subcutánea o intravenosa. Si persisten los signos clínicos de enfermedad respiratoria o entérica 48 horas después de la primera inyección, puede administrarse otra dosis de 6 mg/kg de peso corporal. Se recomienda tratar a los animales a los primeros signos de enfermedad y evaluar su respuesta al tratamiento a las 48 horas.

Para el tratamiento de la mastitis aguda bovina, debe administrarse a 6 mg/kg peso corporal (1 ml/30 kg) en inyección única por vía subcutánea o intravenosa. Los signos clínicos deben controlarse cuidadosamente y debe administrarse la terapia de apoyo correspondiente. Si persisten signos clínicos de mastitis aguda 36-48 horas después de la primera inyección, debe revisarse la estrategia del tratamiento antibiótico. Se recomienda tratar los animales al comienzo de la enfermedad y evaluar la respuesta al tratamiento entre las 36-48 horas.

Para el tratamiento de bovinos con un peso superior a 450 kg, la dosis subcutánea se dividirá de forma que no se inyecten más de 15 ml en el mismo punto.

2.15.7.- PRECAUCIONES Y TIEMPOS DE ESPERA

Según la AEMPS, los animales no deben sacrificarse para el consumo humano durante el periodo de tratamiento.

En el caso de Advocin solución inyectable 25 mg/ml ®, la AEMPS recomienda que para el ganado bovino destinado a carne e inyectado vía intramuscular o intravenosa, esperar

5 días desde la última inyección. En el caso de tratarse de leche, 48 horas después de la última inyección. Y en el caso de carne porcina, esperar 3 días después de la última inyección.

Para Advocin solución inyectable 180 mg/ml ®, la AEMPS recomienda esperar 8 días para carne y 4 días para leche.

Además la FDA detalla una serie de limitaciones:

- Los animales destinados al consumo humano no deben ser sacrificados dentro de 4 días desde el último tratamiento.
- No usar en animales destinados a la producción lechera.
- El tiempo de espera no ha sido establecido para este producto en terneros pre-rumiantes.
- No debe usarse en los terneros que irán destinados a un posterior uso cárnico.
- La ley federal restringe este medicamento en uso o en la orden de un veterinario con licencia. La ley federal prohíbe el uso fuera de etiqueta de este fármaco en animales productores de alimentos.

2.15.8.- CONTRAINDICACIONES

El uso de danofloxacino está contraindicado en caso de hipersensibilidad conocida a los ingredientes activos, a otras fluoroquinolonas o a cualquier ingrediente del producto (Ficha técnica de Advocin®, AEMPS 2009).

2.15.9.- TOXICIDAD Y EFECTOS ADVERSOS

Seguendo las fichas técnicas de la AEMPS, los fenómenos que se describen son los siguientes:

- A) Advocin solución inyectable 25 mg/ml ®: Su aplicación por vía intramuscular puede producir irritación en el punto de inoculación.

- B) Advocin solución inyectable 180 mg/ml ®: En casos muy raros puede ocurrir, en animales sensibles, un shock anafiláctico inmediato o retrasado después de la inyección. La inyección subcutánea del producto provoca una respuesta inflamatoria moderada en el tejido que circunda el punto de inyección. Las lesiones resultantes pueden durar hasta 30 días.

En otros estudios experimentales se han recogido datos de que la administración intramuscular de danofloxacino en caballos, aumentó la actividad de CK (Creatinina Kinasa) hasta 3 veces respecto del nivel basal, pero mucho menor a otras fluoroquinolonas, como enrofloxacino o marbofloxacino demostrando mejor tolerabilidad (Férrandez- Varón y cols., 2006B).

2.15.10.- INTERACCIONES CON MEDICAMENTOS

Según la ficha técnica del antibiótico, no se han descrito interacciones potenciales con otros medicamentos, pero en un estudio realizado con ivermectina en ovejas (Real y cols., 2010), y co-administrado con danofloxacino, reveló que no se producía ningún efecto significativo en los niveles de danofloxacino en plasma, pero si una disminución del 40% en la excreción en leche.

2.15.11.- PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS.

2.15.11.1.- ABSORCIÓN Y BIODISPONIBILIDAD

- OVINO:

En los estudios con danofloxacino administrado por vía intramuscular al ganado ovino, a dosis de 1,25 mg/kg alcanza concentraciones máximas entre 0,32 y 1,2 µg/mL a tiempos entre 0,5-1,23 h (Shem-Tov y cols., 1997; McKellar y cols., 1998; Aliabadi y cols., 2003a).

Por vía vía subcutánea a dosis de 6 mg/kg alcanza una concentración máxima de 1.48 µg/mL y un tiempo máximo de 1.63 h (Escudero y cols., 2007).

La biodisponibilidad es muy alta por ambas vías, siendo del 93.6% por vía subcutánea y ≥95% para la vía intramuscular (Shem-Tov y cols., 1997; McKellar y cols., 1998; Aliabadi S. y cols., 2003c; Escudero y cols., 2007).

- BOVINO:

En el ganado bovino se han realizado estudios farmacocinéticos de danofloxacino en animales sanos a distintas posologías y distintas pautas de administración. Se han utilizado dosis de 1 mg/kg, 1,25 mg/kg y 5 mg/kg por vía intramuscular, y se ha visto que se llegan a alcanzar concentraciones máximas de 0,18, 0,28 y 0,82 µg/mL, respectivamente. El tiempo en alcanzar dichas concentraciones no supera la hora y media en ningún caso (Mann y Frame, 1992; Shem-Tov y cols., 1998).

También se ha estudiado la vía subcutánea a dosis desde 1,25, 5 y 6 mg/kg. Las concentraciones máximas alcanzadas tienen un rango entre 0,21 y 1,25 µg/mL y una Tmax entre 0,23 y 2,17 h. (Mann y Frame, 1992; Mckellar y cols., 1999, Aliabadi S. y Lees, 2003c; Mestorino y cols., 2009)

Si se compara la biodisponibilidad entre ambas vías estudiadas, se observan valores similares, algo mayor para la vía intramuscular, con unos porcentajes $\geq 72\%$. El estudio realizado por Shem-Tov y cols., registró una biodisponibilidad $>$ del 100% tras la administración de danofloxacino intramuscular en vacas lecheras. (Shem-Tov y cols., 1998)

- CAPRINO:

Son varios los estudios realizados con danofloxacino en cabras que administrado intramuscularmente a una dosis de 1,25 mg/kg, alcanzan concentraciones plasmáticas máximas entre 0,29-0,33 µg/mL en el transcurso de 1 hora tras la administración (Atef y cols., 2001; Aliabadi y Lees, 2001; Ismail, 2006). Escudero y cols. estudiaron la farmacocinética de una dosis de 6 mg/kg por vía subcutánea, que condujo a concentraciones y tiempos máximos superiores, de 1,05 µg/mL y 1,64 horas, respectivamente. (Escudero y cols. 2007).

Otro estudio que compara la administración de danofloxacino intramuscular en cabras sanas e inoculadas con endotoxina de *Escherichia coli*, ha mostrado un perfil farmacocinético diferente si se trata de un animal enfermo o sano. Las concentraciones máximas fueron superiores en las cabras febriles (0,42 vs 0,29 µg/mL) y el tiempo necesario para alcanzarlas fue menor (0,75 vs 1 hora) (Ismail, 2006).

La biodisponibilidad de la vía sc e im es elevada ($>95\%$) a excepción del estudio realizado por Atef y cols. donde se obtuvo una biodisponibilidad del 65,7%, debido posiblemente a diferencias en el flujo sanguíneo de la zona de inyección (Atef y cols., 2001; Aliabadi y Lees, 2001; Ismail, 2006; Escudero y cols., 2007).

- PORCINO:

Se han realizado estudios a la dosis de 5 mg/kg por vía intramuscular, y se ha visto que a los 48 minutos se alcanza una concentración máxima de 0.8 µg/mL. El sitio de inyección (cuello o muslo) es independiente y no genera diferencias en el perfil farmacocinético. Por vía oral, presenta una concentración máxima menor (0.42 µg/mL) a partir de las tres horas tras la administración del fármaco. La biodisponibilidad es extensa por ambas vías (Mann y Frame, 1992).

Lauritzen y cols., compararon la administración de danofloxacino a cerdos infectados con *Actinobacillus pleuropneumoniae* a una dosis única de 2.5 mg/kg frente a la misma dosis pero fraccionada en 4 días. El resultado obtenido fueron concentraciones máximas más elevadas con la administración única pero la eficacia del tratamiento fue similar (Lauritzen y cols., 2003).

- AVES:

Se han realizado estudios en animales sanos con dosis de 5 mg/kg y 6 mg/kg por vía oral y las concentraciones plasmáticas alcanzadas varían entre 0.47 y 1.17 µg/mL, las cuales aparecen a partir de las 2.33 horas tras la administración del fármaco (Lynch y cols., 1994; Knoll y cols., 1999; Haritova y cols., 2006; Goudah y Mouneir, 2009; Zeng y cols., 2010). Cuando se trata de animales enfermos, es el caso de pollos infectados con *Pasteurella multocida*, se alcanzó una concentración máxima de 0.43 µg/mL a las 6 horas de la administración. (Zeng y cols., 2010)

Goudah y Mounier, comparan la farmacocinética de danofloxacino administrada por vía intramuscular y oral a dosis de 5 mg/kg en patos. Se alcanzan concentraciones y tiempos máximos similares (0.89 vs 0.81 µg/mL y 1.17 vs 1.21 horas). La biodisponibilidad es superior al 89% en ambas vías, siendo mayor por vía intramuscular (Goudah y Mouneir., 2009).

- OTRAS ESPECIES:

En caballos, la administración de danofloxacino por vía intramuscular, mostró una buena absorción y biodisponibilidad absoluta del 88.49%, similar a otras fluoroquinolonas. Sin embargo, su administración por vía intragástrica a través de una sonda de alimentación,

redujo la disponibilidad al 22.36%, limitando el posible uso oral en estos animales (Fernández-Varón y cols., 2006b).

En burros, a dosis de 1.25mg/kg por vía intramuscular, danofloxacino presenta una Cmax muy baja (0.15µg/ml) comparado con el resto de animales, por lo que deberían de establecerse dosis de carga mayores, sobretodo si tenemos en cuenta su actividad concentración-dependiente (Kum y cols., 2008).

En conejos y tortugas, la administración de danofloxacino a dosis de 6 mg/kg por vía intramuscular y subcutánea, presenta similares perfiles de absorción y una biodisponibilidad elevada (Fernandez-Varón y cols., 2007d; Marín y cols., 2008).

2.15.11.2.-DISTRIBUCIÓN

- OVINO:

En los estudios hallados en la bibliografía danofloxacino alcanza valores de volúmenes de distribución entre 1.9 y 2.73 L/Kg y semividas de eliminación entre 3.07 y 4.6h (Shem-Tov y cols., 1997; McKellar y cols., 1998; Aliabadi y cols., 2003a; Escudero y cols., 2007).

La penetración del fármaco desde el plasma hacia la leche fue rápida y extensa, sobrepasando las concentraciones plasmáticas a los 60-90 minutos tras la administración (Shem-Tov y cols., 1997). En el estudio realizado por Escudero y cols. se obtuvo concentraciones en leche aproximadamente 10 veces superior a las del plasma a las 12 horas post-dosis y 8 veces superior a las 24 horas post-dosis (Escudero y cols., 2007).

Las propiedades farmacocinéticas de danofloxacino en tejidos inflamatorios (exudado) y no inflamatorios (trasudado) fueron evaluadas por Shojaee Aliabadi y cols. Los resultados obtenidos muestran que la penetración del fármaco fue más rápida en el tejido inflamado, y que a partir de las 6 horas post-administración y hasta el fin del muestreo, las concentraciones en ambos fluidos fueron mayores que en plasma. Se obtuvieron AUC de 2.57 y 1.70 h*µg/ml respectivamente. En cuanto a la semivida de eliminación, los valores obtenidos fueron: 3.17 h en plasma, 17.6 h en exudado y 10.5 h en trasudado (Aliabadi y cols., 2003a).

Se midieron y registraron las concentraciones máximas obtenidas tras la administración intramuscular, en plasma (0.43 µg/mL), pulmón (1.51 µg/mL) y la piel interdigital (0.64 µg/mL) a la hora, contenido duodenal (0.81 µg/mL), los ganglios linfáticos (4.61µg/mL) y el cerebro (0.06 µg/mL) a las dos horas, en el yeyuno (10.50µg/mL) e íleon

(5.25 μ g/mL) a las cuatro horas, y en el contenido del colon (8.94 μ g/mL) a las ocho horas (McKellar y cols., 1998).

- BOVINO:

Son varios los estudios que han demostrado la rápida distribución de danofloxacino por todo el organismo en vacas, búfalos y terneros, con volúmenes de distribución en el estado estacionario desde 2.04 hasta 4.3 L/Kg para dosis de 1.25 mg/kg (Friis, 1993; Shem-Tov y cols., 1998; Shojaee Aliabadi y Lees, 2003c; Sappal y cols., 2009) y de 5.79 L/Kg para dosis de 6 mg/kg (Mestorino y cols., 2009).

La semivida de eliminación varía entre las 2.3 y 12.53 h dependiendo de la dosis y la vía de administración. (Mann y Fram, 1992; Friis, 1993; Shem-Tov y cols., 1998; Sarasola y cols., 2002; Aliabadi y Lees, 2003c; Sappal y cols., 2009; Mestorino y cols., 2009). Hubo un caso en el que la semivida de eliminación obtenida tras la inyección de danofloxacino en bolo respecto de su administración en perfusión continua de 36 h, fue aproximadamente el doble (Sarasola y cols., 2002).

La eficacia de un fármaco puede ser afectada por el grado de unión a las proteínas plasmáticas. Para danofloxacino se han registrado porcentajes del 36% (Sappal y cols., 2009) y del 49% (Friis, 1993), que junto con un elevado volumen de distribución, permite una extensa penetración en tejidos y fluidos intracelulares y extravasculares. Se han observado concentraciones muy superiores en leche respecto del plasma, tras 4 horas de la administración del fármaco por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea (Shem-Tov y cols., 1998; Mestorino y cols., 2009). También son elevadas las concentraciones analizadas en nódulos linfáticos mesentéricos, útero, duodeno, yeyuno, ileon, y colon. (Mestorino y cols., 2009).

Shojaee Aliabadi y Lees analizaron aspectos de la distribución extravascular de danofloxacino. Obtuvieron una penetración en el exudado relativamente lenta, pero con una semivida de eliminación casi cuatro veces superior respecto a las del suero (10,16 h para trasudado vs 2,7 h para el suero). En cuanto al AUC del trasudado, éste fue ligeramente superior al suero (1.45 h μ g/ml, frente a 1,24 h μ g/ml) (Shojaee Aliabadi y Lees, 2003c).

Danofloxacino administrado a terneros por vía intravenosa y a una dosis de 1,25 mg/kg, mostró a nivel pulmonar concentraciones máximas a la hora tras la administración. El AUC obtenido fue de 5 h* μ g/ml para tejido pulmonar, 3 h* μ g/ml para la mucosa bronquial,

0.85 h* μ g/ml para las secreciones bronquiales y 0.42 h* μ g/ml para las secreciones nasales. El AUC obtenido en plasma fue de 2.71-2.83 h* μ g/ml (Friis, 1993).

- CAPRINO:

Cuando se estudia danofloxacino en cabras, el rango de volúmenes de distribución en estado estacionario oscila entre 1.41 hasta 3.02 L/Kg para dosis de 1.25 mg/kg (Atef y cols., 2001; Aliabadi y Lees, 2001; Ismail, 2006;) y 7.81 L/Kg para dosis de 6 mg/kg (Escudero y cols. 2007). Cuando se comparan cabras sanas y febriles, no existen grandes diferencias en dicho parámetro farmacocinético: 2.64 L/Kg para sanas y 2.39 L/Kg para febriles (Ismail, 2006).

En cuanto a la semivida de eliminación a dosis de 1.25 mg/kg en cabras sanas, se obtienen valores comprendidos entre 1.35- 4.67 h para la vía intravenosa y entre 2.37- 4.5 h para la vía intramuscular (Atef y cols., 2001; Aliabadi y Lees, 2001; Ismail, 2006;). En cabras enfermas, los valores aumentan hasta 6.54h y 6.65h, respectivamente. A dosis mayores (6 mg/kg) se obtuvo una semivida de 5.46 h para la vía intravenosa y de 4.09 h para la vía subcutánea (Escudero y cols. 2007).

El fármaco presenta una distribución rápida y amplia con un bajo porcentaje (13.55%) de unión a a proteínas plasmáticas (Atef y cols., 2001).

Las concentraciones medias halladas en leche fueron aproximadamente 13 veces mayor que el plasma a las 12h post-dosis y 4 veces superior tras 24 post-dosis (Escudero y cols. 2007).

- PORCINO:

Lindecrona y cols., obtuvieron un volumen de distribución de 5.2 y 3.8 L/Kg y semividas de eliminación de 6.7 y 9.4 h tras la administración intravenosa de una dosis de 2.4 mg/kg en cerdos sanos e infectados con *Salmonella typhimurium*. En ambos grupos, las AUCs obtenidas a lo largo del plexo mesentérico y nódulos linfáticos fueron superiores al plasma. El porcentaje de unión a proteínas plasmáticas también varió ligeramente según fueran animales sanos o infectados, en torno al 44% y 53%, respectivamente (Lindecrona y Friis, 2000).

Tras la administración de una dosis de 5 mg/kg por vía intramuscular, la concentración de danofloxacino fue máxima a la hora de la administración. Además se observó una concentración de fármaco en tejido pulmonar de 4 a 7 veces mayor a la concentración

plasmática. Del mismo estudio se obtuvo una semivida de eliminación de 8, 6.8, 9.8 h para las vías intravenosa, intramuscular y oral (Mann y Frame, 1992).

- AVES:

El volumen de distribución de danofloxacino en estado estacionario para patos es de 5.41 L/Kg, 6.59 L/Kg en pavos y entre 8-10.2 L/Kg en pollos. Las semividas de eliminación varían entre 2.39 y 13.05 h, siendo las de menor valor en el caso de los patos (Lynch y cols., 1994; Knoll y cols., 1999; Haritova y cols., 2006; Goudah y Mouneir, 2009; Zeng y cols., 2010). El elevado volumen de distribución puede atribuirse a su alta solubilidad en lípidos, alta penetración intracelular, unión a transportadores de eflujo ATP-dependiente y baja unión a proteínas plasmáticas (17- 27%) (Haritova y cols., 2006; Goudah y Mouneir, 2009).

Las concentraciones medias en estado estacionario en hígado, riñón, pulmón, traquea, miocardio, músculo, piel y pared cecal fueron superiores a las obtenidas en plasma con una $C_{tejido}/C_{plasma} \geq 1.25$, lo que implica una tendencia del fármaco a distribuirse en los tejidos (Knoll y cols., 1999). El hígado y riñón son fundamentalmente los órganos donde se observa un mayor acumulo de fármaco (Lynch y cols., 1994; Goudah y Mouneir, 2009; Zeng y cols., 2010).

En el cuadro de un proceso infeccioso, las concentraciones de danofloxacino en plasma y tejidos de pollos infectados (a excepción del músculo), fueron más bajas que los animales no infectados. Esto puede deberse al tipo de infección, que afecta a la mucosa intestinal, y por lo tanto a la absorción sistémica del fármaco (Zeng y cols., 2010).

- OTRAS ESPECIES:

En tortugas, caballos, camellos, conejos y monos se han obtenido volúmenes de distribución de 1.02, 2.0, 2.53, 3.16 y 5.95 L/Kg, respectivamente. Las semividas de eliminación oscilan en un rango de 4.74-6.31 h en caballos, 4.88-8.2 h en conejos, 5.37-5.71 h en camellos, 6.36 -7.25 h en burros y 14.70-18.71 h en tortugas (Aliabadi y cols., 2003b; Fernández- Varon y cols., 2006; Fernandez-Varón y cols., 2007; Marín y cols., 2008).

En camellos, danofloxacino penetra muy lentamente en tejidos inflamados y no inflamados, siendo su eliminación dos veces la del plasma, tanto en la administración intravenosa como intramuscular (Aliabadi y cols., 2003b).

2.15.11.3.- METABOLISMO Y EXCRECIÓN

La excreción de Danofloxacino, al igual que otros fármacos del mismo grupo, se produce principalmente por vía renal. En la orina, se presenta mayoritariamente en su forma ionizada, y por tanto presenta una alta solubilidad, que evita su reabsorción por un mecanismo de atrapamiento de iones, siendo de gran utilidad en el tratamiento de infecciones urinarias (Atef y cols., 2001).

En terneros y cerdos, tras administrar tres dosis diarias de danofloxacino a dosis de 2 mg/kg vía intramuscular, las concentraciones medias en orina oscilaron desde 44 hasta 54 µg/ml, excretándose de forma inalterada en un rango de 38 a 51% de la dosis administrada. Las concentraciones de hasta 50 µg/ml obtenidas 24 horas después de la administración parecen suficientes para tratar infecciones del tracto urinario en estos animales. (Mann y Frame, 1992).

En cabras, danofloxacino también se excreta por la orina, y a concentraciones superiores que las del plasma. En este estudio, comparan los parámetros farmacocinéticos tras administrar danofloxacino a una dosis de 1,25 mg/kg de peso, a cabras sanas por vía intravenosa y vía intramuscular. Obtuvieron una vida media de 17,7 y 81,2 min, respectivamente y se detectó fármaco en orina hasta las 24 h tras la administración intravenosa y hasta las 72 h tras la administración intramuscular. (Atef y cols., 2001).

3-. MATERIAL Y 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 Erlemmeyer 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.
- Fosfato monosódico (Lote: 438397/1, Fluka, Madrid).
- Fosfato disódico (Lote: 1341318, Fluka, Madrid).
- Heparina sódica 5% (Lote: C-203, Mayne Pharma, España).
- Ácido trifluoroacético (Lote: 0000104389, Panreac Química, Barcelona).
- Acetonitrilo HPLC (Lote: 08Z4118, VWR Prolabo International, EC).

- Agua para HPLC (Lote: 08I090505, VWR Prolabo International, EC).
- Metanol para HPLC (Lote: 08Z3169, VWR Prolabo International, EC).
- Danofloxacino (Lote: SZBA019XV)
- Danofloxacino experimental: Advocin® 180 (Lote: 9147403, Pfizer).
- Enrofloxacin (Lote: KP041CN , BHC-AH-RDFT)
- Polímero P407: Lutrol® Micro 127 (Lote: W034793, Basf, Alemania).
- Carboximetilcelulosa sal sódica (Lote: 078120164, 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 vertical micro-V (Telstar).
- Centrífuga 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.
- Refrigerador Electrolux® modelo ER 3818C.
- Neveras portátiles isotérmicas.
- Horno microondas Goldstart, modelo MA-894DD.
- Mechero Bunsen.
- Ordenador personal.
- pHmetro Crison Digit 501.
- Termómetros.
- HPLC modelo JASCO, compuesto de:
 - Bomba cuaternaria modelo PV-1585

- Detector de fluorescencia de modelo FP-920 .
- Autoinyector modelo AS-950,
- Desgasificador DG-1580-53
- Módulo mezclador LG-2080-04
- Horno para columnas Peltier JetStream
- PC con el programa ChromPass Chromatography Data System.
- Columnas KINETEX PFP C₁₈ 100 Å -2.6µm, 10 cm x 4,6 mm (Phenomenex)
- Precolumnas ODS Tecnokroma

3.1.4.- SOFTWARE INFORMÁTICO

- Programa de Análisis Farmacocinético Winnonlin Professional[®] 5.2.1 (Pharsightcorporation, USA)
- Programa de análisis farmacocinético MULTIFIT[®] (PROOST, 1997).
- Paquete de análisis estadístico SPSS[®] versión 19.0
- Programa de gráficos SIGMAPLOT 12.3[®]
- Procesador de textos Microsoft[®] Word 2003 y Hoja de cálculo Microsoft[®] Excel 2003.

3.2.- ANIMALES

El estudio se realizó en 5 ovejas, Todas ellas sanas, adultas y de raza Lacaune con pesos que oscilaban entre 72 y 106 Kg. Entre 2,5 y 3,5 años de edad y procedentes de una explotación ovina sanitariamente certificada, en Albacete, la Finca Cuarto Perea. Durante el estudio, se controló su estado sanitario para asegurar la ausencia de enfermedades infecciosas y/o parasitarias y no recibieron ningún fármaco durante al menos 15 días antes del inicio de la experiencia. Los animales seleccionados fueron separados del resto del grupo en un corral contiguo para facilitar su manejo, y se identificaron asignándoles su número en el collar. Se alimentaron a base de pienso y heno de alfalfa y tuvieron acceso al agua de bebida *ad libitum*.

3.3.- PROTOCOLO EXPERIMENTAL

El antibiótico utilizado fue danofloxacino (Advocin 180 ®, Pfizer). Se administró una dosis de 6 mg/kg en solución acuosa por vía intravenosa (IV) y vía subcutánea (SC) y para las dos formulaciones de liberación controlada se preparó una dosis tres veces superior, 18 mg/kg, en solución de P407 al 25% (formulación SC1) y en solución de P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% (formulación SC2).

El estudio fue de tipo cruzado 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:

	ANIMAL	Vías de administración			
Fase		IV*	SC*	SC1*	SC2*
1	Oveja	A,B	C	D	E
2	Oveja	E	A,B	C	D
3	Oveja	D	E	A,B	C
4	Oveja	C	D	E	A,B

La dosis de antibiótico utilizada según el peso de cada animal se detalla en la tabla siguiente:

ANIMAL	IV*	SC*	SC1*	SC2*
Oveja A (77 kg)	462 mg	462 mg	1386 mg	1386 mg
Oveja B (81 kg)	486 mg	486 mg	1458 mg	1458 mg
Oveja C (97 kg)	582 mg	582 mg	1746 mg	1746 mg
Oveja D (106 kg)	636 mg	636 mg	1908 mg	1908 mg
Oveja E (72 kg)	432 mg	432 mg	1296 mg	1296 mg

* Vía intravenosa (IV), vía subcutánea (SC), vía subcutánea en solución de P407 al 25% (SC1), vía subcutánea en solución de P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% (SC2).

TABLA 1.- Dosis de antibiótico utilizada según el peso de cada animal.

Para preparar las formulaciones de liberación controlada, el volumen requerido para cada animal de la solución acuosa refrigerada de danofloxacino (18 mg/kg) se vertió lentamente en un vial que contenía la cantidad apropiada de P407. La dispersión fue homogenizada mediante agitación orbital hasta su completa disolución. En el caso de la formulación con carboximetilcelulosa como coadyuvante, la cantidad requerida de coadyuvante para cada administración se pesó y disolvió en solución acuosa, a 4°C, de danofloxacino, y esta mezcla fue adicionada a los viales que contenían la cantidad apropiada de P407.

- **Administración intravenosa:**

La solución acuosa de danofloxacino se administró a cada uno de los animales objetos de estudio en la vena yugular derecha. La dosis administrada fue de 6 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, 36, 48 y 72 h desde la administración IV del fármaco y centrifugadas inmediatamente a 1500g 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 solución acuosa de danofloxacino y de las dos formulaciones en solución de P407 al 25% y en solución de P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% se administraron a nivel escapular, a una dosis de 6 y 18 mg/kg por peso corporal respectivamente, todas 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, 36, 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 1500g 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 (previamente, convenientemente depilado), 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, etc.

- **Recogida de muestras de leche:**

Se estudió la eliminación del danofloxacino y su paso a leche en el grupo de ovejas estudiadas. 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.

3.4.-TÉCNICAS ANALÍTICAS

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección por fluorescencia es el método que se ha utilizado para determinar la concentración de danofloxacino en plasma y leche de oveja. Este método sigue el procedimiento descrito por SIEFERT y cols. (1999) para moxifloxacino modificado.

El procesamiento de las muestras fue el que se detalla a continuación: en un tubo eppendorf con 200 µL de plasma o leche se añaden 200 µL de acetonitrilo, que hace que las proteínas precipiten y 5 µL de patrón interno, que en este caso fue una dilución de enrofloxacino de 100000 µg/L. Posteriormente, son sometidas a agitación en un baño de ultrasonidos seguido de centrifugación durante 10 min a 3000 rpm. Del sobrenadante se extraen 200 µL y se transfiere a los viales del autoinyector del HPLC. Estos 200 µL se diluyen 4 veces con 600 µL de la misma fase móvil que se utiliza para la columna del HPLC.

La separación se llevó a cabo utilizando una columna de fase reversa KINETEX PFP C18 100 Å -2.6µm, 10 cm x 4,6 mm (Phenomenex). Precolumnas ODS Tecnokroma. Tanto las muestras dentro del autoinyector (sistema Peltier), como la columna fueron termostatzadas a 23°C. La fase móvil estaba compuesta por acetonitrilo (18%) y ácido trifluoroacético en solución (1 g/L) (82%). La velocidad de flujo de la misma fue de 1,6

mL/min y el volumen de muestra inyectado en cada vez al HPLC fue de 20 µL. La detección se realizó a una longitud de onda de excitación de 280 nm y una longitud de onda de emisión de 440 nm.

3.5.-VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA

3.5.1-LINEALIDAD

Las curvas de calibrado se prepararon con 8 concentraciones diferentes de enrofloxacino entre 5 y 1000 µg/L usando blancos de plasma o leche de las oveja. Se adicionó como estándar interno el enrofloxacino. Las curvas estándar o patrón se obtuvieron por representación de la relación entre el área de los picos del danofloxacino y el enrofloxacino, frente a concentraciones conocidas del danofloxacino. Cada punto se estableció de un promedio de tres determinaciones. El coeficiente de correlación (r) fue siempre > 0,99 para todas las curvas de calibrado. A todas las muestras analizadas se le añadió 5 µL de patrón interno de enrofloxacino de 100000 µg/L que se preparaba mezclando 1 mL de disolución madre de enrofloxacino 200000 µg/L con 1 mL de metanol. Las alícuotas de plasma y leche se almacenaron a - 45 °C hasta su procesamiento.

Las alícuotas de los estándares, controles y muestras fueron procesadas como se describió anteriormente y se inyectaron 20 µL en el sistema cromatográfico.

3.5.2.- RECUPERACIÓN

Los porcentajes de recuperación se determinaron comparando las áreas de los picos de los controles con distintas concentraciones de fármaco (concretamente a 50, 200 y 1000 µg/L, tanto para le leche como para el plasma), con las áreas de los picos de los estándares a las concentraciones correspondientes preparados con fase móvil. Cada punto se establece a partir de un promedio de tres determinaciones. Los porcentajes de recuperación de danofloxacino tanto en plasma como en leche, se muestran a continuación en la Tabla 2:

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/L}$)	RECUPERACIÓN (%) DANOFLOXACINO	
	PLASMA	LECHE
50	82,12	92,40
500	97,72	104,40
1000	75,42	100,97

TABLA 2.- Porcentajes de recuperación de danofloxacino en plasma y en leche.

3.5.3.- PRECISIÓN

La precisión del ensayo se evaluó expresando la 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, < 2%. 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 los siguientes: en plasma, < 7%, y en leche, < 4%.

- **Límite de cuantificación y detección**

El límite de detección de danofloxacino 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 5 $\mu\text{g/L}$ de danofloxacino. En cuanto al límite de cuantificación, en plasma y leche también fue de 5 $\mu\text{g/L}$.

3.6- ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO

3.6.1.- ANÁLISIS COMPARTIMENTAL DE DATOS PLASMATICOS.

Una vez obtenidas las concentraciones de danofloxacino en plasma a los diferentes tiempos de extracción tras la administración, se han ajustado los datos a las ecuaciones mono

y bicompartimental mediante el programa WinNonlin Professional® (versión 5.2.1) y el programa MULTIFIT, propuesto por Proost (1997) y basado en Yamaoka y cols. (1981). Los ajustes se han realizado empleando varios tipos de ponderación:

- 1-Inversa de las concentraciones experimentales
- 2-Inversa de las concentraciones teóricas
- 3-Inversa de las concentraciones experimentales al cuadrado
- 4- Inversa de las concentraciones teóricas al cuadrado

Una vez realizados los ajustes a los diferentes modelos farmacocinéticos, el criterio utilizado para determinar cuál era la ecuación que mejor se ajustaba a los datos observados fue el Criterio de Información de Akaike ó AIC (Yamaoka y cols., 1978), cuya expresión es:

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

Donde N es el número de puntos experimentales y p el número de parámetros del modelo en cuestión. La expresión contenida entre corchetes 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. El modelo con el valor mínimo de AIC se considera el óptimo.

3.6.2.- ANÁLISIS NO COMPARTIMENTAL DE DATOS PLASMÁTICOS

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 5.0).

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

$$F = \frac{AUC_{ev}}{AUC_{iv}} \cdot 100$$

3.6.3.- ANÁLISIS DE DATOS EN 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 5.0). Se calcularon los siguientes parámetros no compartimentales: $C_{máx}$, $T_{máx}$, AUC, $t_{1/2\lambda_z}$, y MRT.

También se calculó el porcentaje de excreción de danofloxacino.

3.7.- MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Se ha realizado un análisis estadístico con el programa SPSS 19.0 con el fin de obtener datos estadísticos de interés, y de evaluar la homogeneidad de los datos utilizados.

Para el análisis general de las variables se han empleado los métodos descriptivos básicos para las variables cuantitativas, obteniendo la media, desviación estándar y el coeficiente de variación.

Para comprobar la homogeneidad de los datos, se ha realizado el test de Levene. Esta prueba realiza un test de hipótesis para comprobar si existe o no igualdad en las varianzas. Para ello se han establecido como hipótesis nulas, que las concentraciones de danofloxacino 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.

Por otra parte, se han utilizado otros dos test estadísticos no paramétricos para comprobar si existen o no diferencias significativas de los parámetros farmacocinéticos obtenidos entre las diferentes vías de administración del fármaco, y los animales utilizados. El primero de ellos es la prueba de Kruskal-Wallis para contrastar si los valores para cada parámetro farmacocinético son iguales o diferentes entre:

- a) Todas las vías de administración (IV, SC, SC1 y SC2).
- b) Las vías extavasculares (SC, SC1 y SC2).

Cuando se detecta la existencia de diferencias estadísticamente significativas en alguna de las vías de administración, se realiza un segundo análisis no paramétrico, la prueba

U de Mann-Whitney para dos muestras independientes, para determinar entre qué vías se presentan las diferencias.

Las diferencias consideradas estadísticamente significativas son aquellas cuya p obtenida es menor de 0,05.

3.8.- CÁLCULO DE LAS CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS (CMI)

Para este estudio, se compararon las CMI de doce cepas distintas de *Staphylococcus aureus* obtenidas de ovejas de España en 2012.

Las CMI se determinaron mediante el método de dilución en agar NCCLS (Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards; NCCLS, 2000). Tras incubar a +37°C durante una noche, el inóculo fue suspendido en solución salina al 0,9% NaCl hasta obtener una suspensión estándar de 0,5 según la escala de McFarland (que equivale, aproximadamente, a 1.5×10^8 UFC/mL). Posteriormente fueron diluidas 1:30 en medio de cultivo 15 minutos antes de su análisis (concentración de $5,0 \times 10^6$ UFC/mL). Las pruebas de CMI fueron realizadas en placas de poli-estireno que contienen 96 celdillas. Las placas contenían diluciones de antimicrobiano (concentraciones de danofloxacino comprendidas entre 0,250 - 0,0625 mg/L) con 100 μ L/celda de agar Mueller-Hinton que fueron inoculadas con las diferentes cepas. Cada cepa a estudiar fue inoculada en su respectiva placa, añadiendo en cada celdilla, 10 μ L de inóculo, alcanzando una concentración final aproximada de 5×10^4 UFC/mL.

Las placas fueron incubadas a +37°C y se observaron a las 24 horas. Se definió la concentración mínima inhibitoria como la mínima concentración que inhibía el crecimiento de los microorganismos. Las cepas utilizadas como control fueron *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) y *Escherichia coli* (ATCC 25922).

4-. RESULTADOS

4.1.- ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA DE DANOFLOXACINO

Los valores de concentración plasmática de danofloxacino, obtenidos tras la administración intravenosa de 6 mg/kg de danofloxacino de peso a ovejas, se muestran en la Tabla 1. En todos los casos, se observa cómo, 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, como puede observarse, además, en los gráficos 1 (representaciones semilogarítmicas correspondientes a cada animal) y 2 (representación semilogarítmica de las concentraciones medias).

Tiempo (h)	Oveja A	Oveja B	Oveja C	Oveja D	Oveja E	MEDIA	SD	CV
0,083	5113,94	8038,54	7220,29	4761,90	6167,11	6260,36	1383,09	22,09
0,166	3804,33	5089,50	4604,26	3725,30	4296,87	4304,05	568,28	13,20
0,25	3279,75	5231,83	4171,16	3401,46	4701,46	4157,13	835,51	20,10
0,5	2515,48	4159,83	3160,58	3164,98	3162,75	3232,73	589,21	18,23
0,75	2307,14	3412,38	2451,50	3161,24	3009,75	2868,40	471,82	16,45
1	2257,74	2901,99	2021,70	2676,63	2413,97	2454,40	345,42	14,07
1,5	2000,62	2838,35	1641,03	2393,43	1917,77	2158,24	465,84	21,58
2	1288,71	1715,29	1144,89	2032,52	1430,01	1522,29	354,64	23,30
4	775,06	1012,66	503,26	991,00	707,89	797,97	211,45	26,50
6	332,41	453,22	187,13	386,47	288,62	329,57	100,62	30,53
8	185,42	195,62	123,46	183,37	159,45	169,46	28,94	17,08
10	122,59	119,39	89,96	119,97	92,73	108,93	16,12	14,80
12	88,03	63,93	55,83	65,97	54,34	65,62	13,49	20,56
24	6,73	8,70	-	8,07	6,46	7,49	1,07	14,30

TABLA 1.- Concentraciones plasmáticas experimentales de danofloxacino en función del tiempo (h), expresadas en $\mu\text{g/L}$, en cada oveja tras la administración intravenosa de una dosis de 6 mg/kg junto con los parámetros estadísticos asociados.

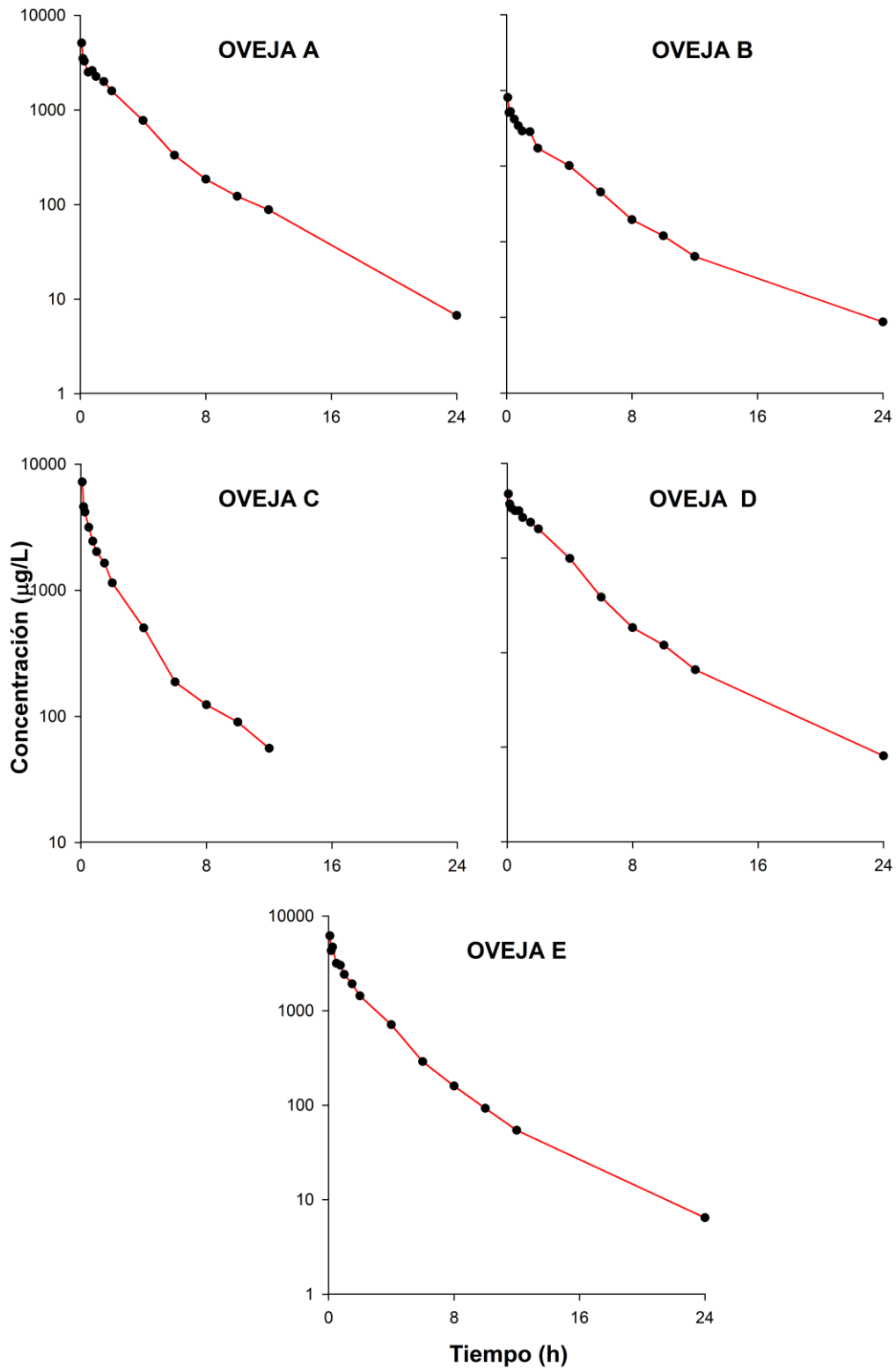


Gráfico 1.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones experimentales de danofloxacino obtenidas tras la administración intravenosa de una dosis de 6 mg/kg a cada oveja.

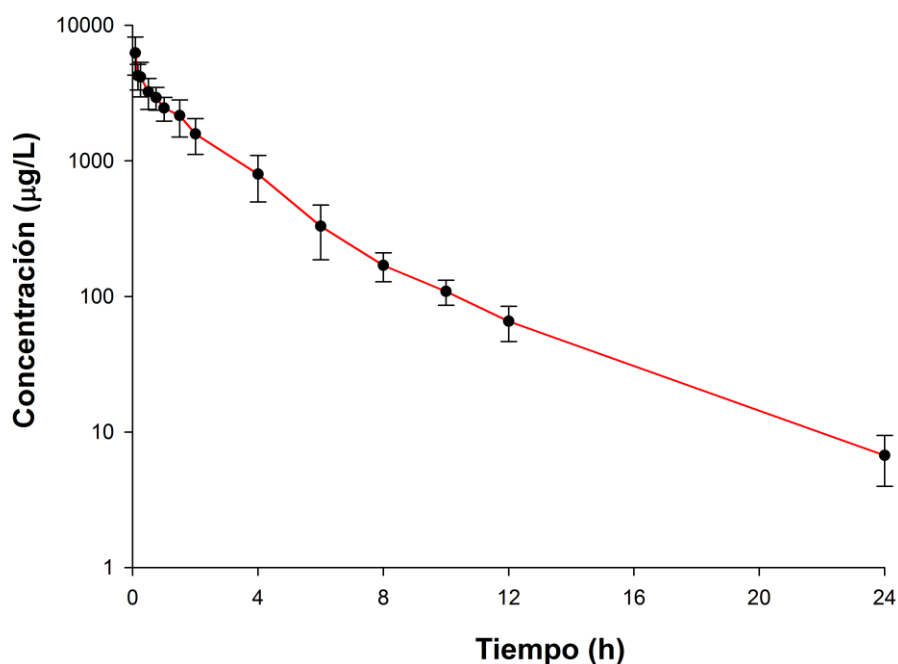


Gráfico 2.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de danofloxacino obtenidas en oveja tras la administración intravenosa de una dosis de 6 mg/kg.

Para comprobar la homogeneidad de los datos, se ha realizado la prueba de Levene en el que se han establecido como hipótesis nulas, que las concentraciones de danofloxacino 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) (Tabla 2). Una vez comprobada la no existencia de diferencias significativas entre animales, la única fuente de variación será el tiempo. Realizando la misma prueba se confirma la homogeneidad de los datos de concentración a un tiempo determinado.

Pruebas de Homogeneidad de Varianzas para la Concentración		
Prueba de Levene para Concentración por Tiempo	Valor-P*	<0,001*
Prueba de Levene para Concentración por Animales	Valor-P*	0,341

TABLA 2.- Prueba de Levene para las concentraciones plasmáticas de danofloxacino tras la administración intravenosa de una dosis de 6mg/kg a ovejas.

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

Una vez estudiada la homogeneidad de los datos, se lleva a cabo el ajuste de los mismos a modelos compartimentales utilizando el programa de análisis farmacocinético WINNONLIN Professional® (versión 5.0), sin ponderación y con ponderación de los datos, obteniéndose mejores resultados cuando se ponderaban las concentraciones. Además, utilizando el Criterio de Información de Akaike AIC (Yamaoka y cols., 1978) se obtiene que los datos se ajustan mejor a un modelo bicompartimental en el que las concentraciones se ponderan respecto a su inverso al cuadrado. Los valores de AIC se detallan a continuación (Tabla 3).

Valores de AIC Oveja A Vía IV, Modelo MonoCompartimental		Valores de AIC Oveja B Vía IV, Modelo MonoCompartimental	
AIC 1/Y	159,55	AIC 1/Y	171,80
AIC 1/Yat	103,08	AIC 1/Yat	140,41
AIC 1/Y*Y	96,68	AIC 1/Y*Y	99,79
AIC 1/Yat*Yat	11,36	AIC 1/Yat*Yat	37,5
Valores de AIC Oveja A Vía IV, Modelo BiCompartimental		Valores de AIC Oveja B Vía IV, Modelo BiCompartimental	
AIC 1/Y	134,19	AIC 1/Y	152,66
AIC 1/Yat	75,42	AIC 1/Yat	121,87
AIC 1/Y*Y	76,99	AIC 1/Y*Y	68,99
AIC 1/Yat*Yat	- 11,75	AIC 1/Yat*Yat	-2,08

Valores de AIC Oveja C Vía IV, Modelo MonoCompartimental	
AIC 1/Y	158,78
AIC 1/Yat	127,66
AIC 1/Y*Y	75,91
AIC 1/Yat*Yat	33,52
Valores de AIC Oveja C Vía IV, Modelo BiCompartimental	
AIC 1/Y	130,76
AIC 1/Yat	104,96
AIC 1/Y*Y	79,91
AIC 1/Yat*Yat	12,99

Valores de AIC Oveja D Vía IV, Modelo MonoCompartmental		Valores de AIC Oveja E Vía IV, Modelo MonoCompartmental	
AIC 1/Y	147,45	AIC 1/Y	156,96
AIC 1/Yat	149,20	AIC 1/Yat	139,46
AIC 1/Y*Y	85,53	AIC 1/Y*Y	95,92
AIC 1/Yat*Yat	37,16	AIC 1/Yat*Yat	24,00
Valores de AIC Oveja D Vía IV, Modelo BiCompartmental		Valores de AIC Oveja E Vía IV, Modelo BiCompartmental	
AIC 1/Y	150,94	AIC 1/Y	-
AIC 1/Yat	151,08	AIC 1/Yat	142,78
AIC 1/Y*Y	53,80	AIC 1/Y*Y	77,75
AIC 1/Yat*Yat	16,78	AIC 1/Yat*Yat	22,81

TABLA 3.- Valores de AIC obtenidos tras ajustar las concentraciones plasmáticas experimentales de danofloxacino a una dosis de 6 mg/kg por vía intravenosa, a los distintos modelos farmacocinéticos.

Los parámetros farmacocinéticos derivados de dicho modelo, para cada animal, junto con los parámetros estadísticos asociados, se muestran en la Tabla 4, mientras que en la Tabla 5 se muestran los resultados del estudio farmacocinético no compartimental, para cada animal junto con los parámetros estadísticos asociados.

Parámetros	Oveja A	Oveja B	Oveja C	Oveja D	Oveja E	MEDIA	SD	CV
C_0 (ug/L)	3054,27	4839,94	4796,69	3899,27	4182,72	4611,15	571,00	12,38
Cl (ug/L)	980,87	450,15	850,83	283,00	424,13	500,77	211,20	42,18
$t_{1/2\lambda_1}$ (h) *	1,05	1,34	0,57	1,59	1,15	1,14	0,34	29,93
$t_{1/2\lambda_2}$ (h) *	3,34	4,22	3,04	4,59	4,18	3,87	0,65	16,90
λ_1 (1/h)	0,66	0,52	1,22	0,44	0,60	0,69	0,31	45,22
λ_2 (1/h)	0,21	0,16	0,23	0,15	0,17	0,18	0,03	17,92
k_{10} (1/h)	0,43	0,44	0,74	0,39	0,49	0,50	0,14	28,30
k_{12} (1/h)	0,11	0,05	0,10	0,03	0,08	0,07	0,03	45,45
k_{21} (1/h)	0,32	0,19	0,38	0,17	0,21	0,25	0,09	35,60
Vss (L/Kg)	2,05	1,43	2,00	1,69	1,79	1,79	0,25	14,07
Cl (L/h/Kg)	0,64	0,50	0,78	0,55	0,63	0,62	0,11	17,49

TABLA 4.- Parámetros farmacocinéticos bicompartimentales deducidos tras la administración intravenosa de danofloxacino, a dosis de 6 mg/kg, a cada una de las ovejas a partir de sus correspondientes ecuaciones de ajuste, junto con los parámetros estadísticos asociados.

Parámetros	Oveja A	Oveja B	Oveja C	Oveja D	Oveja E	MEDIA	SD	CV
AUC_{0-24} ($\mu\text{g}\times\text{h/L}$)	9346,16	12754,73	8466,49	11345,90	9833,86	10349,43	1522,91	14,71
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\times\text{h/L}$)	9758,52	12808,01	8482,86	11396,50	9879,74	10465,13	1491,84	14,26
MRT (h)	3,13	2,81	2,47	3,06	2,77	2,86	0,25	8,60
Cl (L/kg/h)	0,61	0,47	0,71	0,53	0,61	0,58	0,08	13,94
V _{ss} (L/kg)	1,98	1,32	1,75	1,61	1,68	1,66	0,20	12,23
V _z (L/kg)	2,95	2,86	3,14	3,28	4,25	3,29	0,51	15,42

TABLA 5.- Parámetros farmacocinéticos no compartimentales obtenidos para cada oveja tras la administración intravenosa de danofloxacino a dosis de 6 mg/kg, junto con los parámetros estadísticos asociados.

4.2.-ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA DE DANOFLOXACINO

En la Tabla 6 se muestran los valores de concentración plasmática de danofloxacino obtenidos tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg de peso, junto con sus valores medios y estadísticos asociados. Se observa como en los cinco animales, a partir del primer tiempo de extracción, la concentración del fármaco va aumentando hasta aproximadamente 1 – 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 (h)	Oveja A	Oveja B	Oveja C	Oveja D	Oveja E	MEDIA	SD	CV
0,083	103,07	197,73	165,32	128,03	83,5	135,53	46,29	34,16
0,166	238,10	565,59	464,23	205,66	136,6	322,03	183,38	56,94
0,25	401,48	656,81	539,85	359,90	196,7	430,95	175,83	40,80
0,5	896,86	963,29	874,04	745,50	255,10	746,96	286,07	38,30
0,75	1537,70	1419,23	1182,52	976,86	573,19	1137,90	382,69	33,63
1	1693,14	1625,55	1542,42	1233,93	877,19	1394,45	338,32	24,26
1,5	2094,36	1839,44	2107,97	1388,17	1300,61	1746,11	383,25	21,95
2	1828,57	1706,93	1877,22	1568,58	1368,54	1669,97	206,53	12,37
4	1632,17	1547,12	1642,25	1396,47	1346,99	1513,00	135,29	8,94
6	871,83	656,26	776,35	470,44	861,40	727,26	167,56	23,04
8	450,92	332,53	290,50	246,79	595,06	383,16	140,75	36,73
10	282,19	212,67	151,20	118,25	359,25	224,71	97,84	43,54
12	181,51	134,14	97,54	91,43	246,38	150,20	64,64	43,04
24	18,77	22,61	19,30	15,52	22,21	19,68	2,88	14,65
32	-	6,28	6,77	5,14	5,93	6,02	0,68	11,38

TABLA 6.- Concentraciones plasmáticas experimentales de danofloxacino en función del tiempo (h), expresadas en $\mu\text{g/L}$, en cada oveja tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg junto con los parámetros estadísticos asociados.

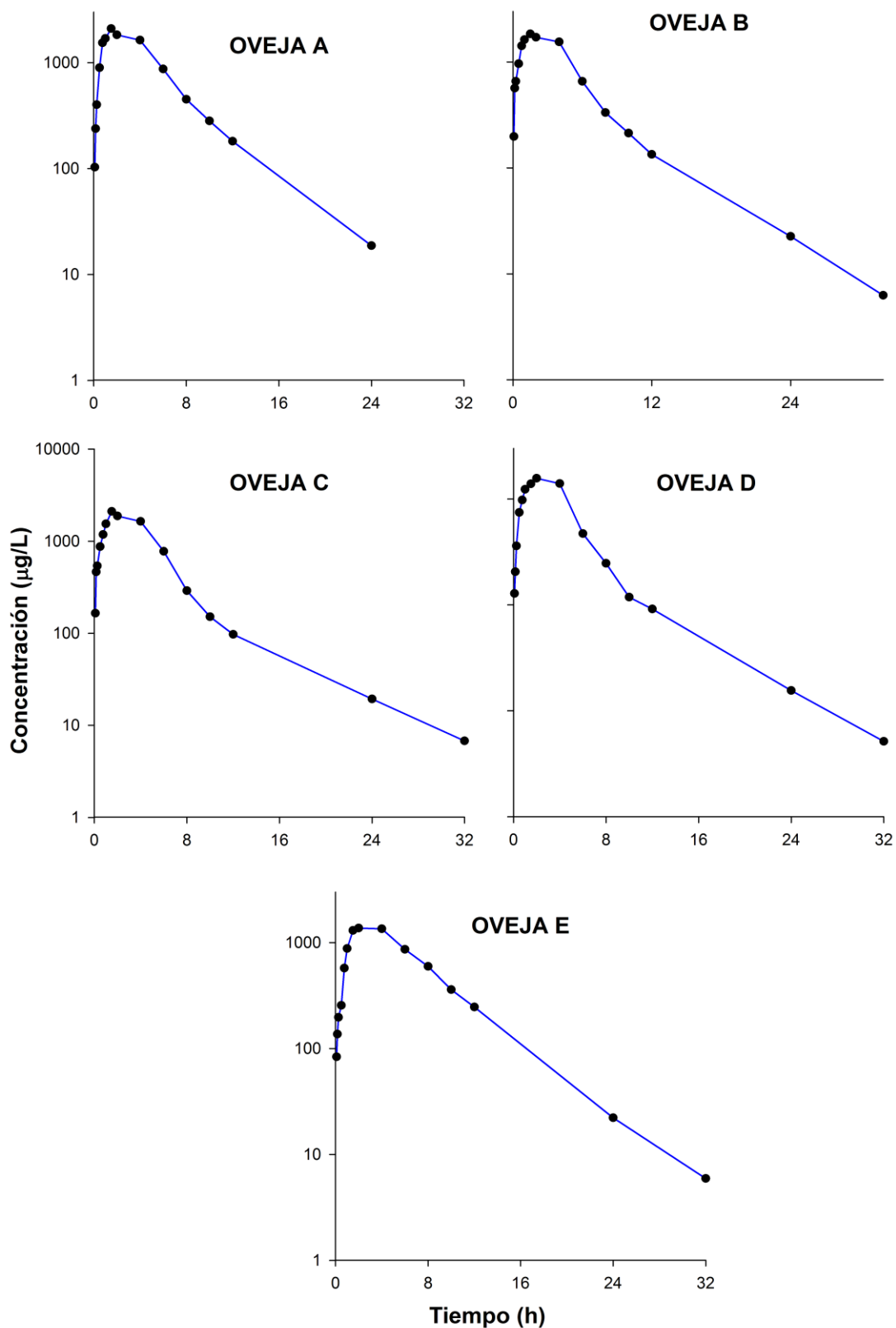


Gráfico.3 Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones experimentales de danofloxacino obtenidas tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg a cada oveja.

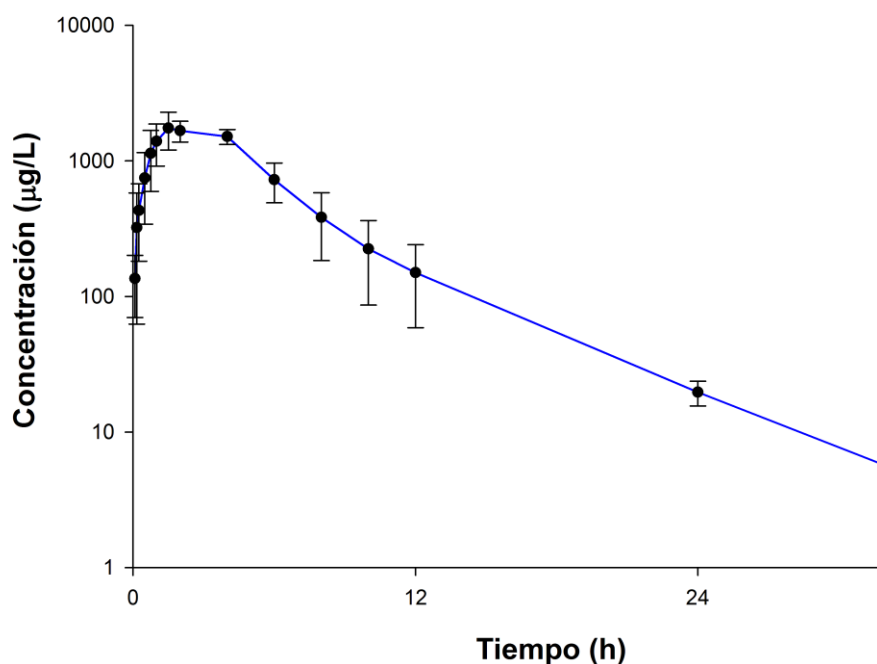


Gráfico 4.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de danofloxacino obtenidas tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg a ovejas.

Al igual que en la administración intravenosa, la homogeneidad de los datos se ha comprobado mediante la prueba de Levene, que confirma la “normalidad” de las concentraciones a un mismo tiempo en todos los animales. (Tabla 7).

Pruebas de Homogeneidad de Varianzas para la Concentración		
Prueba de Levene para Concentración por Tiempo	Valor-P*	<0,001*
Prueba de Levene para Concentración por Animales	Valor-P*	0,213

TABLA 7.- Prueba de Levene para las concentraciones plasmáticas de danofloxacino tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg a ovejas.

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

Las concentraciones experimentales de cada animal se han ajustado a modelos compartimentales. Las concentraciones ajustadas a un modelo bicompartimental ponderadas a su inverso al cuadrado considerando el tiempo de latencia por tratarse de

una vía extravascular, han obteniendo mejores resultados, con un menor valor de AIC (Tabla 8). Cabe destacar que, al contrario de lo que ocurría tras la administración intravenosa, existe una mayor variabilidad en los valores de AIC.

Valores de AIC Oveja A Vía SC, Modelo MonoCompartimental Sin Tiempo de Latencia		Valores de AIC Oveja A Vía SC, Modelo BiCompartimental Sin Tiempo de Latencia	
AIC 1/Y	155,75	AIC 1/Y	156,64
AIC 1/Yat	111,95	AIC 1/Yat	95,70
AIC 1/Y*Y	116,99	AIC 1/Y*Y	96,86
AIC 1/Yat*Yat	27,18	AIC 1/Yat*Yat	-2,53
Valores de AIC Oveja A Vía SC, Modelo MonoCompartimental Con Tiempo de Latencia		Valores de AIC Oveja A Vía SC, Modelo BiCompartimental Con Tiempo de Latencia	
AIC 1/Y	157,57	AIC 1/Y	158,34
AIC 1/Yat	114,97	AIC 1/Yat	97,64
AIC 1/Y*Y	118,16	AIC 1/Y*Y	97,10
AIC 1/Yat*Yat	28,76	AIC 1/Yat*Yat	-0,54

Valores de AIC Oveja B Vía SC, Modelo MonoCompartimental Sin Tiempo de Latencia		Valores de AIC Oveja B Vía SC, Modelo BiCompartimental Sin Tiempo de Latencia	
AIC 1/Y	155,00	AIC 1/Y	157,75
AIC 1/Yat	109,48	AIC 1/Yat	97,95
AIC 1/Y*Y	102,95	AIC 1/Y*Y	85,95
AIC 1/Yat*Yat	24,71	AIC 1/Yat*Yat	0,31
Valores de AIC Oveja B Vía SC, Modelo MonoCompartimental Con Tiempo de Latencia		Valores de AIC Oveja B Vía SC, Modelo BiCompartimental Con Tiempo de Latencia	
AIC 1/Y	144,63	AIC 1/Y	144,60
AIC 1/Yat	107,00	AIC 1/Yat	87,95
AIC 1/Y*Y	100,92	AIC 1/Y*Y	67,58
AIC 1/Yat*Yat	23,67	AIC 1/Yat*Yat	-16,44

Valores de AIC Oveja C Vía SC, Modelo MonoCompartimental Sin Tiempo de Latencia		Valores de AIC Oveja C Vía SC, Modelo BiCompartimental Sin Tiempo de Latencia	
AIC 1/Y	141,51	AIC 1/Y	144,66
AIC 1/Yat	111,11	AIC 1/Yat	94,56
AIC 1/Y*Y	94,78	AIC 1/Y*Y	70,03
AIC 1/Yat*Yat	28,32	AIC 1/Yat*Yat	0,58
Valores de AIC Oveja C Vía SC, Modelo MonoCompartimental Con Tiempo de Latencia		Valores de AIC Oveja C Vía SC, Modelo BiCompartimental Con Tiempo de Latencia	
AIC 1/Y	142,69	AIC 1/Y	145,67
AIC 1/Yat	113,43	AIC 1/Yat	95,96
AIC 1/Y*Y	95,86	AIC 1/Y*Y	71,46
AIC 1/Yat*Yat	30,06	AIC 1/Yat*Yat	0,59

Valores de AIC Oveja D Vía SC, Modelo MonoCompartmental Sin Tiempo de Latencia		Valores de AIC Oveja D Vía SC, Modelo BiCompartmental Sin Tiempo de Latencia	
AIC 1/Y	144,15	AIC 1/Y	147,58
AIC 1/Yat	99,15	AIC 1/Yat	93,10
AIC 1/Y*Y	98,43	AIC 1/Y*Y	78,79
AIC 1/Yat*Yat	19,03	AIC 1/Yat*Yat	-1,89
Valores de AIC Oveja D Vía SC, Modelo MonoCompartmental Con Tiempo de Latencia		Valores de AIC Oveja D Vía SC, Modelo BiCompartmental Con Tiempo de Latencia	
AIC 1/Y	142,55	AIC 1/Y	145,64
AIC 1/Yat	100,02	AIC 1/Yat	92,18
AIC 1/Y*Y	99,34	AIC 1/Y*Y	76,97
AIC 1/Yat*Yat	21,01	AIC 1/Yat*Yat	-3,90

Valores de AIC Oveja E Vía SC, Modelo MonoCompartmental Sin Tiempo de Latencia		Valores de AIC Oveja E Vía SC, Modelo BiCompartmental Sin Tiempo de Latencia	
AIC 1/Y	158,47	AIC 1/Y	162,16
AIC 1/Yat	95,91	AIC 1/Yat	98,98
AIC 1/Y*Y	99,02	AIC 1/Y*Y	99,53
AIC 1/Yat*Yat	5,58	AIC 1/Yat*Yat	-
Valores de AIC Oveja E Vía SC, Modelo MonoCompartmental Con Tiempo de Latencia		Valores de AIC Oveja E Vía SC, Modelo BiCompartmental Con Tiempo de Latencia	
AIC 1/Y	161,93	AIC 1/Y	165,10
AIC 1/Yat	64,12	AIC 1/Yat	-
AIC 1/Y*Y	118,27	AIC 1/Y*Y	101,54
AIC 1/Yat*Yat	-4,2	AIC 1/Yat*Yat	10,01

TABLA 8.- Valores de AIC obtenidos tras ajustar las concentraciones plasmáticas experimentales de danofloxacino a una dosis de a 6 mg/kg por vía subcutánea, a los distintos modelos farmacocinéticos.

Los parámetros correspondientes a dicho ajuste para cada animal se presentan en la Tabla 9 junto con los valores medios, y sus estadísticos de desviación. Mientras que, los parámetros correspondientes al análisis no compartimental, para cada animal, como para los valores medios y estadísticos asociados, se presentan en la Tabla 10.

Parámetros	Oveja A	Oveja B	Oveja C	Oveja D	Oveja E	MEDIA	SD	CV
$C_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{g/L}$)	1859,57	1887,79	1930,06	1531,85	1338,58	1709,57	260,82	15,26
$T_{m\acute{a}x}$ (h)	2,20	1,91	2,02	2,04	2,78	2,19	0,35	15,76
C_1 ($\mu\text{g/L}$)	29773,52	35214,35	54491,29	28627,27	20260,51	33673,39	12809,54	38,04
C_z ($\mu\text{g/L}$)	882,52	671,03	258,60	226,56	598,17	527,38	280,40	53,17
C_a ($\mu\text{g/L}$)	30656,05	35885,38	54749,89	28853,83	20858,68	34200,77	12691,24	37,11
λ_1 (1/h)	0,45	0,52	0,49	0,47	0,35	0,46	0,07	14,28
λ_z (1/h)	0,17	0,14	0,11	0,12	0,14	0,14	0,02	16,01
k_a (1/h)	1,34	1,17	1,30	1,29	1,70	1,36	0,20	14,80
$t_{1/2\lambda_1}$ (h)*	1,54	1,32	1,43	1,47	1,98	1,55	0,25	16,41
$t_{1/2\lambda_z}$ (h)*	4,20	4,80	6,16	5,94	4,78	5,18	0,84	16,17
$t_{1/2\lambda_a}$ (h)*	0,52	0,59	0,53	0,54	0,41	0,52	0,07	13,10
V_{ss} (L/Kg)	1,64	1,84	1,63	2,07	2,13	1,86	0,23	12,45
Cl (L/h/Kg)	0,49	0,53	0,52	0,65	0,55	0,55	0,06	11,01

TABLA 9.- Parámetros farmacocinéticos bicompartimentales deducidos tras la administración subcutánea de danofloxacino, a dosis de 6 mg/kg, a cada una de las ovejas a partir de sus correspondientes ecuaciones de ajuste junto con sus valores medios y estadísticos asociados.

Parámetros	Oveja A	Oveja B	Oveja C	Oveja D	Oveja E	MEDIA	SD	CV
AUC_{0-24} ($\mu\text{g}\times\text{h/L}$)	12037,73	10634,76	10822,55	8496,31	10558,54	10509,98	1275,20	12,13
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\times\text{h/L}$)	12136,28	10776,21	10969,37	8608,31	10692,74	10636,59	1274,40	11,98
MRT (h)	5,15	5,07	4,78	4,83	6,31	5,23	0,62	11,90
MAT (h)	2,34	2,31	1,62	2,37	3,26	2,38	0,58	24,43
Cl/F (L/kg/h)	0,49	0,56	0,55	0,70	0,56	0,57	0,08	13,16
V_z/F (L/kg)	2,60	3,50	4,13	5,00	3,37	3,72	0,90	24,21
F (%)	123,60	84,14	129,31	75,53	108,23	104,16	23,70	22,76

TABLA 10.- Parámetros farmacocinéticos no compartimentales obtenidos para cada oveja tras la administración subcutánea de danofloxacino a dosis de 6 mg/kg junto con sus valores medios y estadísticos asociados.

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

Los valores de concentración plasmática de danofloxacino obtenidos tras la administración subcutánea de una dosis de danofloxacino, en solución del polímero P407 al 25%, de 18 mg/kg de peso a ovejas aparecen reflejados en la Tabla 11 junto con sus valores medios y estadísticos asociados. En los cinco 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 32 horas.

Tiempo (h)	Oveja A	Oveja B	Oveja C	Oveja D	Oveja E	MEDIA	SD	CV
0,083	109,65	165,77	116,44	41,77	103,71	107,47	44,20	41,13
0,166	216,03	389,02	521,10	175,44	236,84	307,69	144,11	46,84
0,25	547,84	589,47	1308,97	322,23	661,83	686,07	370,61	54,02
0,5	1325,83	1439,50	2590,25	1354,26	1708,04	1683,58	528,83	31,41
0,75	2161,65	1576,98	2777,78	2076,29	2725,09	2263,56	498,57	22,03
1	2172,45	3145,56	4283,31	2347,40	3289,47	3047,64	844,28	27,70
1,5	2828,95	2597,98	4370,30	2557,80	4768,83	3424,77	1059,57	30,94
2	3699,25	2394,31	3643,72	2974,83	4436,96	3429,81	776,53	22,64
4	2559,81	1294,69	2985,07	2889,02	3668,26	2679,37	872,77	32,57
6	1508,38	921,05	1194,51	2174,52	2324,29	1624,55	609,39	37,51
8	1194,48	645,82	565,63	1215,60	1193,51	963,01	327,50	34,01
10	654,22	536,69	258,54	554,02	722,93	545,28	177,34	32,52
12	444,65	298,64	171,81	273,50	368,19	311,36	102,55	32,93
24	26,67	35,57	12,73	52,15	17,91	29,01	15,59	53,75
32	10,32	14,97	5,00	22,24	10,06	12,51	6,47	51,75

TABLA 11.- Concentraciones plasmática experimentales de danofloxacino, expresadas en $\mu\text{g/L}$, en cada oveja tras la administración subcutánea de una dosis de 18 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 18 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% se muestran en los Gráficos 5 y 6, a los distintos tiempos de extracción.

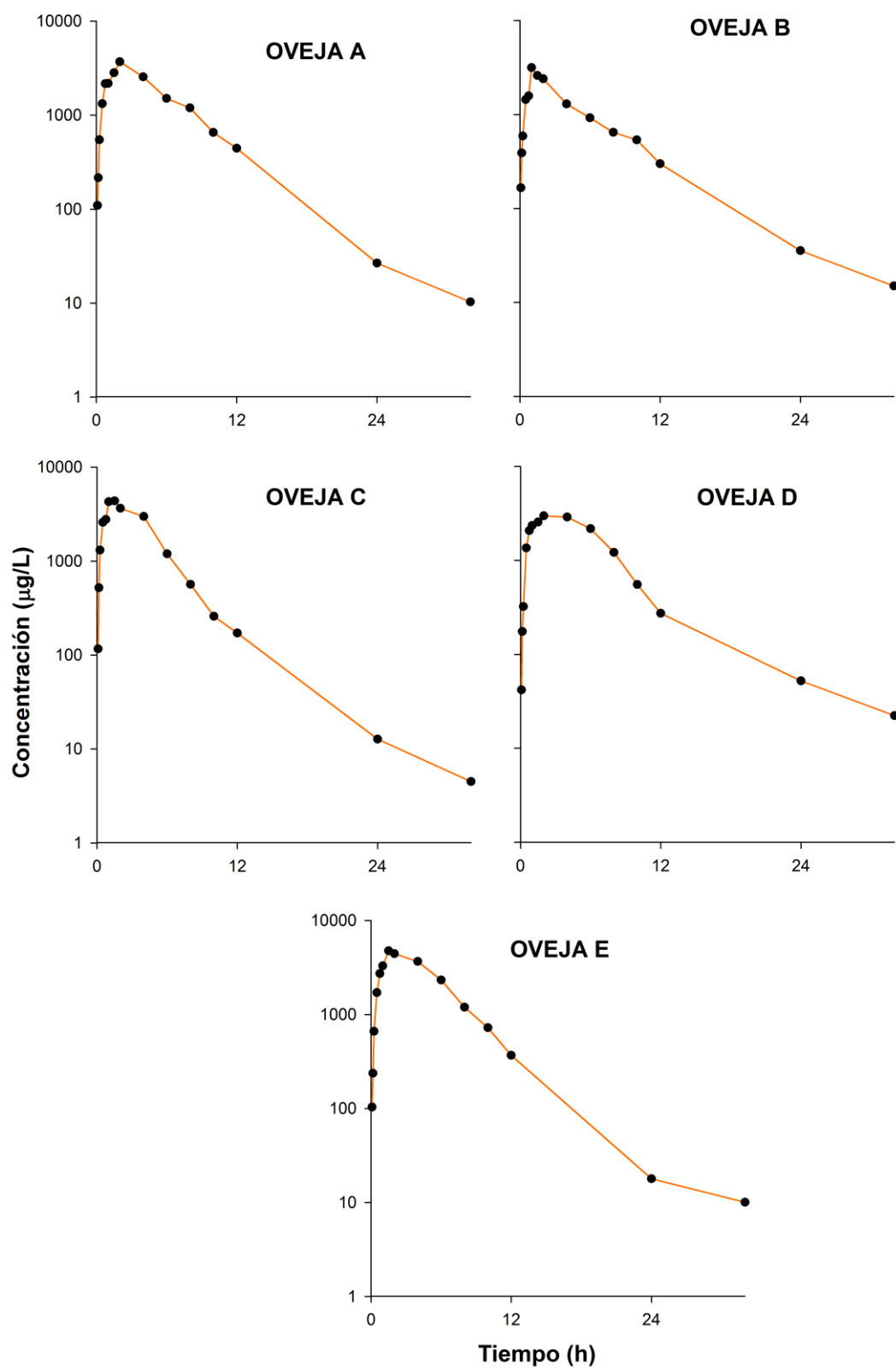


Gráfico 5.- Representación gráfica de las concentraciones experimentales semilogarítmicas de danofloxacino obtenidas tras la administración subcutánea de una dosis de 18 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% a cada oveja.

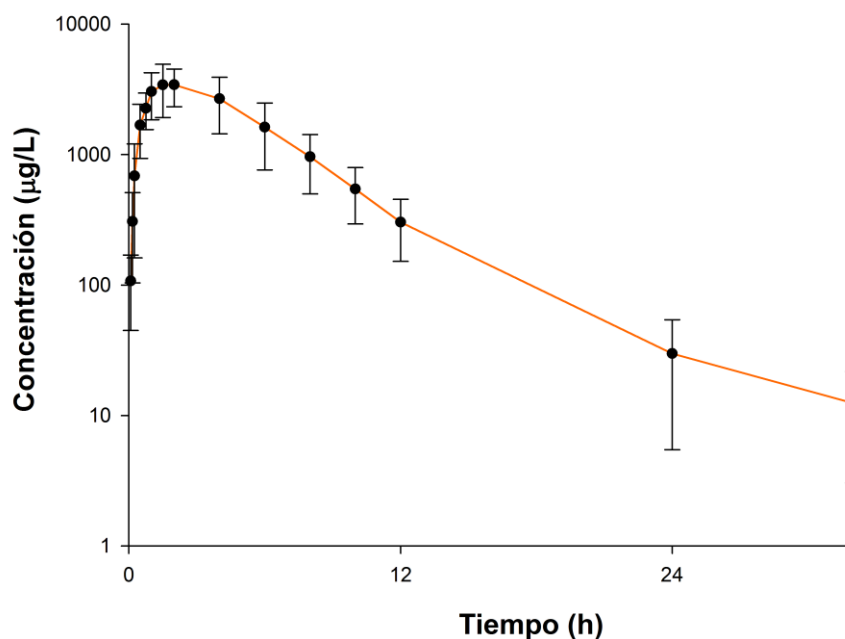


Gráfico 6.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de danofloxacino obtenidas tras la administración subcutánea de una dosis de 18 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% a oveja.

La prueba de Levene demuestra la homogeneidad de los datos, tal y como se aprecia en la Tabla 12.

Pruebas de Homogeneidad de Varianzas para la Concentración		
Prueba de Levene para Concentración por Tiempo	Valor-P*	<0,001*
Prueba de Levene para Concentración por Animales	Valor-P*	0,160

TABLA 12.- Prueba de Levene para las concentraciones plasmáticas de danofloxacino en solución del polímero P407 al 25%, administración subcutánea de una dosis de 18 mg/kg a ovejas.

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

En cuanto al modelo compartimental, los valores de AIC indican que, en este caso, el modelo más adecuado es el bicompartimental con tiempo de latencia (Tabla 13).

Valores de AIC Oveja A Vía SC, Modelo MonoCompartimental Sin Tiempo de Latencia		Valores de AIC Oveja A Vía SC, Modelo BiCompartimental Sin Tiempo de Latencia	
AIC 1/Y	167,97	AIC 1/Y	171,46
AIC 1/Yat	114,56	AIC 1/Yat	114,37
AIC 1/Y*Y	87,17	AIC 1/Y*Y	82,98
AIC 1/Yat*Yat	19,23	AIC 1/Yat*Yat	10,85
Valores de AIC Oveja A Vía SC, Modelo MonoCompartimental Con Tiempo de Latencia		Valores de AIC Oveja A Vía SC, Modelo BiCompartimental Con Tiempo de Latencia	
AIC 1/Y	154,46	AIC 1/Y	157,17
AIC 1/Yat	95,44	AIC 1/Yat	94,77
AIC 1/Y*Y	86,78	AIC 1/Y*Y	81,55
AIC 1/Yat*Yat	12,82	AIC 1/Yat*Yat	-11,50

Valores de AIC Oveja B Vía SC, Modelo MonoCompartimental Sin Tiempo de Latencia		Valores de AIC Oveja B Vía SC, Modelo BiCompartimental Sin Tiempo de Latencia	
AIC 1/Y	182,66	AIC 1/Y	184,20
AIC 1/Yat	110,39	AIC 1/Yat	110,72
AIC 1/Y*Y	124,68	AIC 1/Y*Y	123,91
AIC 1/Yat*Yat	8,46	AIC 1/Yat*Yat	6,61
Valores de AIC Oveja B Vía SC, Modelo MonoCompartimental Con Tiempo de Latencia		Valores de AIC Oveja B Vía SC, Modelo BiCompartimental Con Tiempo de Latencia	
AIC 1/Y	179,04	AIC 1/Y	182,10
AIC 1/Yat	107,33	AIC 1/Yat	98,02
AIC 1/Y*Y	119,05	AIC 1/Y*Y	115,43
AIC 1/Yat*Yat	2,91	AIC 1/Yat*Yat	-4,81

Valores de AIC Oveja C Vía SC, Modelo MonoCompartimental Sin Tiempo de Latencia		Valores de AIC Oveja C Vía SC, Modelo BiCompartimental Sin Tiempo de Latencia	
AIC 1/Y	172,64	AIC 1/Y	176,67
AIC 1/Yat	125,28	AIC 1/Yat	117,02
AIC 1/Y*Y	96,80	AIC 1/Y*Y	92,67
AIC 1/Yat*Yat	33,24	AIC 1/Yat*Yat	11,35
Valores de AIC Oveja C Vía SC, Modelo MonoCompartimental Con Tiempo de Latencia		Valores de AIC Oveja C Vía SC, Modelo BiCompartimental Con Tiempo de Latencia	
AIC 1/Y	150,77	AIC 1/Y	153,82
AIC 1/Yat	110,89	AIC 1/Yat	104,87
AIC 1/Y*Y	92,91	AIC 1/Y*Y	58,74
AIC 1/Yat*Yat	28,86	AIC 1/Yat*Yat	-8,46

Valores de AIC Oveja D Vía SC, Modelo MonoCompartimental Sin Tiempo de Latencia		Valores de AIC Oveja D Vía SC, Modelo BiCompartimental Sin Tiempo de Latencia	
AIC 1/Y	196,18	AIC 1/Y	200,21
AIC 1/Yat	129,83	AIC 1/Yat	129,63
AIC 1/Y*Y	126,01	AIC 1/Y*Y	127,70
AIC 1/Yat*Yat	28,61	AIC 1/Yat*Yat	23,30
Valores de AIC Oveja D Vía SC, Modelo MonoCompartimental Con Tiempo de Latencia		Valores de AIC Oveja D Vía SC, Modelo BiCompartimental Con Tiempo de Latencia	
AIC 1/Y	182,17	AIC 1/Y	183,42
AIC 1/Yat	105,01	AIC 1/Yat	114,86
AIC 1/Y*Y	124,24	AIC 1/Y*Y	114,14
AIC 1/Yat*Yat	15,13	AIC 1/Yat*Yat	-5,06

Valores de AIC Oveja E Vía SC, Modelo MonoCompartimental Sin Tiempo de Latencia		Valores de AIC Oveja D Vía SC, Modelo BiCompartimental Sin Tiempo de Latencia	
AIC 1/Y	188,33	AIC 1/Y	158,17
AIC 1/Yat	112,68	AIC 1/Yat	83,57
AIC 1/Y*Y	129,15	AIC 1/Y*Y	122,33
AIC 1/Yat*Yat	15,28	AIC 1/Yat*Yat	1,63
Valores de AIC Oveja E Vía SC, Modelo MonoCompartimental Con Tiempo de Latencia		Valores de AIC Oveja D Vía SC, Modelo BiCompartimental Con Tiempo de Latencia	
AIC 1/Y	192,42	AIC 1/Y	159,87
AIC 1/Yat	113,98	AIC 1/Yat	76,48
AIC 1/Y*Y	131,04	AIC 1/Y*Y	120,66
AIC 1/Yat*Yat	13,52	AIC 1/Yat*Yat	-33,81

TABLA 13.- Valores de AIC obtenidos tras ajustar las concentraciones plasmáticas experimentales de danofloxacino en solución del polímero P407 al 25%, a una dosis de a 18 mg/kg y administración subcutánea, a los distintos modelos farmacocinéticos.

En la Tabla 14 se muestran los parámetros correspondientes al ajuste bicompartimental para cada uno de los animales, con sus valores medios y estadísticos asociados. Los parámetros no compartimentales se muestran en la Tabla 15.

Parámetros	Oveja A	Oveja B	Oveja C	Oveja D	Oveja E	MEDIA	SD	CV
$C_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{g/L}$)	2489,16	2201,16	2881,84	2097,24	3017,73	2537,42	405,74	15,99
$T_{m\acute{a}x}$ (h)	2,83	2,31	2,18	2,79	2,69	2,56	0,29	11,52
C_1 ($\mu\text{g/L}$)	48517,90	8660,78	52074,67	50656,60	74046,51	46791,29	23678,15	50,60
C_z ($\mu\text{g/L}$)	134,37	324,11	22,39	343,41	33,91	171,64	154,42	89,97
C_a ($\mu\text{g/L}$)	48652,27	8984,88	52097,06	51000,01	74080,41	46962,93	23575,42	50,20
λ_1 (1/h)	0,33	0,32	0,43	0,35	0,35	0,36	0,04	11,83
λ_z (1/h)	0,09	0,10	0,05	0,09	0,05	0,07	0,02	31,35
k_a (1/h)	0,38	0,60	0,50	0,39	0,39	0,45	0,10	21,25
$t_{\frac{1}{2}\lambda_1}$ (h)*	2,08	2,19	1,63	1,98	1,96	1,97	0,21	10,78
$t_{\frac{1}{2}\lambda_z}$ (h)*	7,96	7,17	14,51	7,85	13,84	10,27	3,59	34,98
$t_{\frac{1}{2}\lambda_a}$ (h)*	1,82	1,15	1,40	1,78	1,76	1,58	0,29	18,62
Vd (L/Kg)	3,20	5,04	2,89	4,49	2,63	3,65	1,06	28,91
Cl (L/h/Kg)	0,91	1,14	1,03	1,04	0,80	0,98	0,13	13,17

TABLA 14.- Parámetros farmacocinéticos bicompartimentales deducidos tras la administración subcutánea de danofloxacino en solución del polímero P407 al 25%, a dosis de 18 mg/kg, a cada una de las oveja a partir de sus correspondientes ecuaciones de ajuste junto con sus valores medios y estadísticos de desviación.

Parámetros	Oveja A	Oveja B	Oveja C	Oveja D	Oveja E	MEDIA	SD	CV
AUC_{0-24} ($\mu\text{g}\times\text{h/L}$)	21663,13	14768,13	20452,60	22104,86	27657,15	21329,18	4598,16	21,56
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\times\text{h/L}$)	21901,76	15111,79	20613,20	22618,05	27899,35	21628,83	4579,19	21,17
MRT (h)	5,72	6,07	4,25	6,08	5,12	5,45	0,77	14,21
MAT (h)	2,55	3,26	1,79	3,02	2,35	2,59	0,58	22,32
Cl/F (L/kg/h)	0,91	1,14	1,03	1,04	0,80	0,98	0,13	13,17
Vz/F (L/kg)	7,94	12,09	17,50	8,24	8,59	10,87	4,06	37,38
F (%)	57,00	59,38	60,29	76,78	94,13	69,52	15,84	22,78

TABLA 15.- Parámetros farmacocinéticos no compartimentales obtenidos para cada oveja tras la administración subcutánea de danofloxacino en solución del polímero P407 al 25% a una dosis de 18 mg/kg ajuste junto con sus valores medios y estadísticos de desviación.

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

La Tabla 16 muestra los valores de concentración plasmática de danofloxacin obtenidos tras la administración subcutánea de una dosis de 18 mg/kg de peso en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% junto con los estadísticos de desviación. Se puede observar como en los cinco animales, a partir del primer tiempo de extracción, la concentración del fármaco va aumentando hasta aproximadamente las 2-6 horas, y posteriormente desciende de manera gradual, detectándose concentraciones plasmáticas hasta las 48 horas.

Tiempo (h)	Oveja A	Oveja B	Oveja C	Oveja D	Oveja E	MEDIA	SD	CV
0,083	178,25	202,76	224,92	91,23	134,48	166,33	53,75	32,32
0,166	475,34	401,35	451,67	128,60	264,02	344,20	145,71	42,33
0,25	788,75	561,57	572,74	403,48	586,24	582,56	137,06	23,53
0,5	1587,30	1062,42	961,17	868,06	942,61	1084,31	289,61	26,71
0,75	2182,54	1734,64	1877,93	1543,21	1462,22	1760,11	286,69	16,29
1	3165,37	2358,49	2790,35	2110,04	2387,05	2562,26	416,08	16,24
1,5	4058,72	3114,83	2710,57	2802,14	3398,14	3216,88	543,21	16,89
2	4425,61	3505,26	2675,74	4453,26	4192,53	3850,48	759,99	19,74
4	4018,91	2850,06	2023,81	3389,83	3648,26	3186,17	776,61	24,37
6	4093,81	1711,22	1113,67	1825,01	2358,53	2220,45	1136,79	51,20
8	2001,34	1370,52	697,8	1296,30	1582,36	1389,66	474,09	34,12
10	1144,78	975,2	534,42	748,54	1112,35	903,06	258,46	28,62
12	593,68	653,73	351,51	524,69	630,22	550,77	121,59	22,08
24	93,13	89,31	41,34	26,11	98,04	69,58	33,32	47,89
32	54,69	48,78	28,10	14,70	54,82	40,22	17,99	44,73
48	19,90	15,49	12,76	-	16,58	16,18	2,95	18,25

TABLA 16.- Concentraciones plasmática experimentales de danofloxacin, expresadas en µg/L, en cada oveja tras la administración subcutánea de una dosis de 18 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% junto con sus estadísticos asociados.

En los Gráficos 7 y 8 podemos observar las concentraciones plasmáticas obtenidas en cada animal tras su administración subcutánea en solución del polímero

P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2%, junto con los valores medios de las concentraciones plasmáticas (media \pm SD), a los distintos tiempos de extracción.

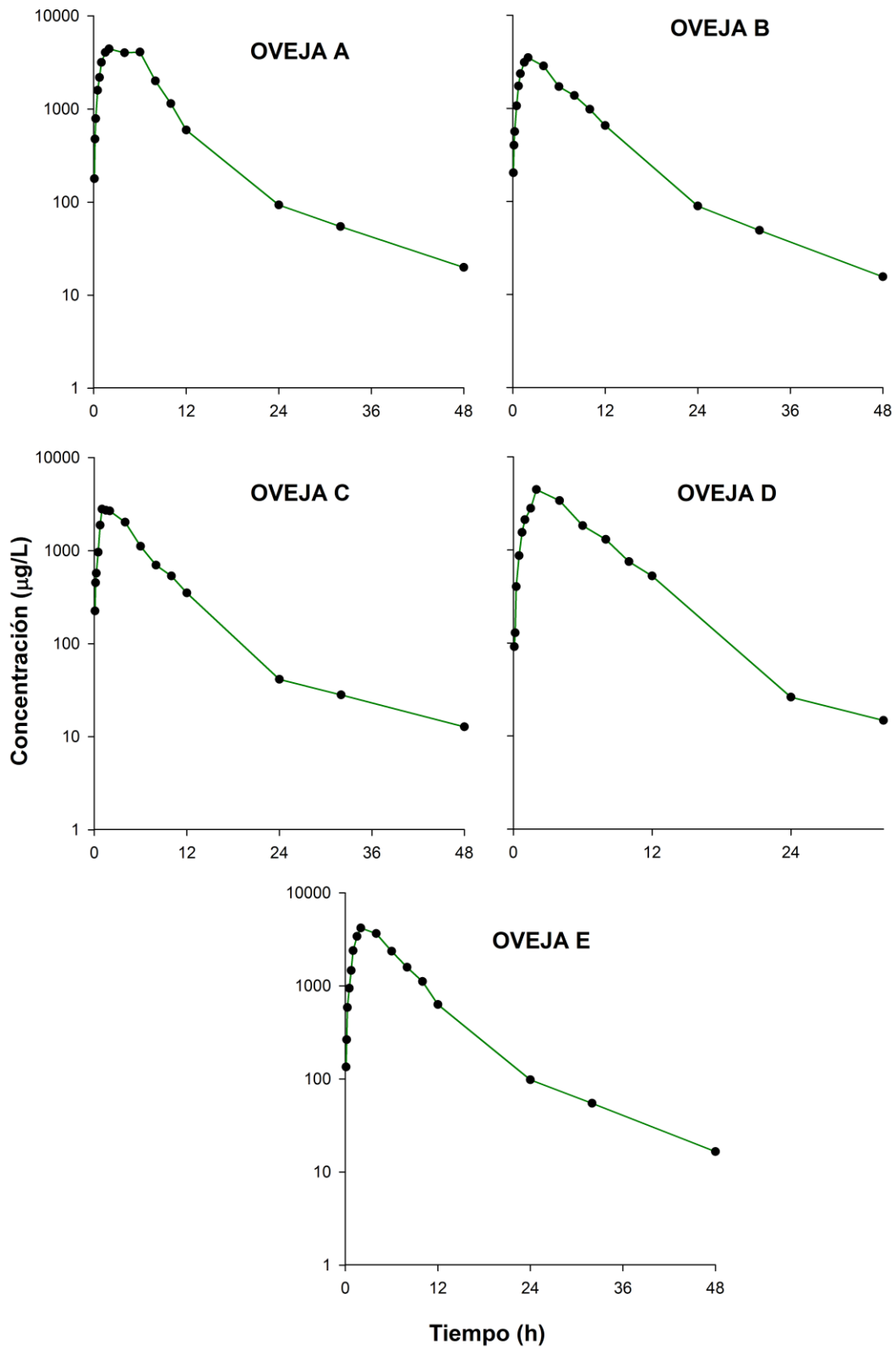


Gráfico 7- Representación gráfica de las concentraciones experimentales semilogarítmicas de danofloxacino obtenidas tras la administración subcutánea de una dosis de 18 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% a cada oveja.

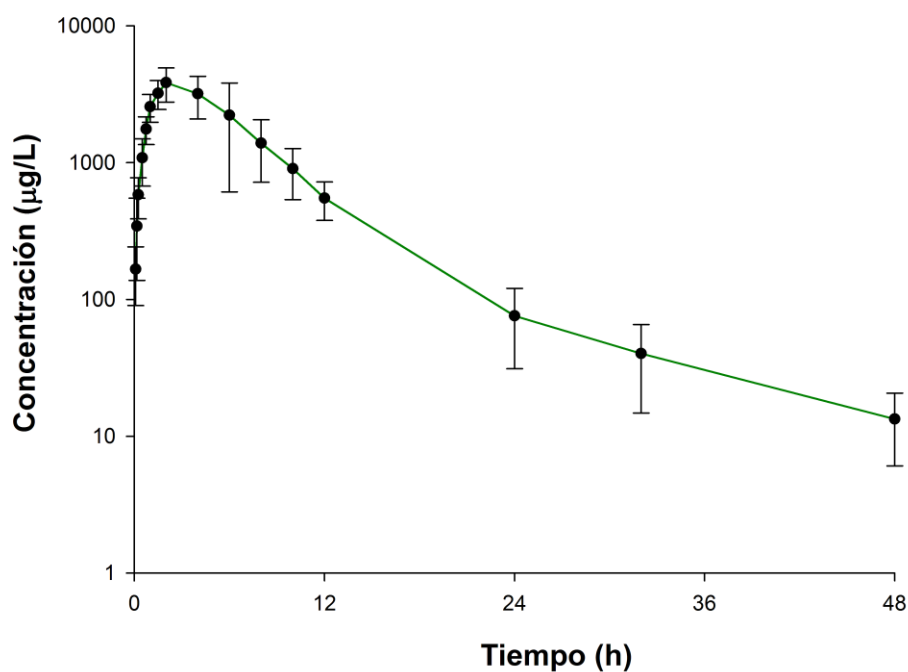


Gráfico 8.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de danofloxacino obtenidas tras la administración subcutánea de una dosis de 18 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% a cada oveja.

La homogeneidad de los datos ha sido contrastada mediante la prueba de Lavene (Tabla17).

Pruebas de Homogeneidad de Varianzas para la Concentración		
Prueba de Levene para Concentración por Tiempo	Valor-P*	<0,001*
Prueba de Levene para Concentración por Animales	Valor-P*	0,190

TABLA 17- Prueba de Levene para las concentraciones plasmáticas de danofloxacino en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2%, administración subcutánea de una dosis de 18 mg/kg a ovejas.

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

Los valores de AIC (Tabla 18) obtenidos muestran que el modelo más adecuado en este caso es bicompartimental, con tiempo de latencia.

Valores de AIC Oveja A Vía SC, Modelo MonoCompartimental Sin Tiempo de Latencia		Valores de AIC Oveja A Vía SC, Modelo BiCompartimental Sin Tiempo de Latencia	
AIC 1/Y	193,15	AIC 1/Y	-
AIC 1/Yat	120,81	AIC 1/Yat	113,66
AIC 1/Y*Y	151,81	AIC 1/Y*Y	138,62
AIC 1/Yat*Yat	17,84	AIC 1/Yat*Yat	2,01
Valores de AIC Oveja A Vía SC, Modelo MonoCompartimental Con Tiempo de Latencia		Valores de AIC Oveja A Vía SC, Modelo BiCompartimental Con Tiempo de Latencia	
AIC 1/Y	187,60	AIC 1/Y	-
AIC 1/Yat	112,62	AIC 1/Yat	-
AIC 1/Y*Y	149,3	AIC 1/Y*Y	118,01
AIC 1/Yat*Yat	16,29	AIC 1/Yat*Yat	-10,71

Valores de AIC Oveja B Vía SC, Modelo MonoCompartimental Sin Tiempo de Latencia		Valores de AIC Oveja B Vía SC, Modelo BiCompartimental Sin Tiempo de Latencia	
AIC 1/Y	179,93	AIC 1/Y	180,68
AIC 1/Yat	104,66	AIC 1/Yat	100,33
AIC 1/Y*Y	134,38	AIC 1/Y*Y	111,50
AIC 1/Yat*Yat	6,43	AIC 1/Yat*Yat	-16,35
Valores de AIC Oveja B Vía SC, Modelo MonoCompartimental Con Tiempo de Latencia		Valores de AIC Oveja B Vía SC, Modelo BiCompartimental Con Tiempo de Latencia	
AIC 1/Y	178,14	AIC 1/Y	178,60
AIC 1/Yat	96,52	AIC 1/Yat	98,80
AIC 1/Y*Y	135,08	AIC 1/Y*Y	110,10
AIC 1/Yat*Yat	7,97	AIC 1/Yat*Yat	-19,45

Valores de AIC Oveja C Vía SC, Modelo MonoCompartimental Sin Tiempo de Latencia		Valores de AIC Oveja C Vía SC, Modelo BiCompartimental Sin Tiempo de Latencia	
AIC 1/Y	182,40	AIC 1/Y	182,50
AIC 1/Yat	121,23	AIC 1/Yat	123,17
AIC 1/Y*Y	144,36	AIC 1/Y*Y	145,98
AIC 1/Yat*Yat	24,47	AIC 1/Yat*Yat	25,87
Valores de AIC Oveja C Vía SC, Modelo MonoCompartimental Con Tiempo de Latencia		Valores de AIC Oveja C Vía SC, Modelo BiCompartimental Con Tiempo de Latencia	
AIC 1/Y	182,50	AIC 1/Y	185,70
AIC 1/Yat	123,17	AIC 1/Yat	112,48
AIC 1/Y*Y	145,98	AIC 1/Y*Y	136,74
AIC 1/Yat*Yat	25,87	AIC 1/Yat*Yat	11,83

Valores de AIC Oveja D Vía SC, Modelo MonoCompartmental Sin Tiempo de Latencia		Valores de AIC Oveja D Vía SC, Modelo BiCompartmental Sin Tiempo de Latencia	
AIC 1/Y	188,94	AIC 1/Y	192,97
AIC 1/Yat	126,69	AIC 1/Yat	-
AIC 1/Y*Y	116,12	AIC 1/Y*Y	113,61
AIC 1/Yat*Yat	25,13	AIC 1/Yat*Yat	-
Valores de AIC Oveja D Vía SC, Modelo MonoCompartmental Con Tiempo de Latencia		Valores de AIC Oveja D Vía SC, Modelo BiCompartmental Con Tiempo de Latencia	
AIC 1/Y	180,16	AIC 1/Y	183,59
AIC 1/Yat	91,13	AIC 1/Yat	-
AIC 1/Y*Y	122,72	AIC 1/Y*Y	122,23
AIC 1/Yat*Yat	14,56	AIC 1/Yat*Yat	-13,98

Valores de AIC Oveja E Vía SC, Modelo MonoCompartmental Sin Tiempo de Latencia		Valores de AIC Oveja E Vía SC, Modelo BiCompartmental Sin Tiempo de Latencia	
AIC 1/Y	201,28	AIC 1/Y	203,89
AIC 1/Yat	124,46	AIC 1/Yat	121,43
AIC 1/Y*Y	148,89	AIC 1/Y*Y	140,60
AIC 1/Yat*Yat	17,69	AIC 1/Yat*Yat	8,5
Valores de AIC Oveja E Vía SC, Modelo MonoCompartmental Con Tiempo de Latencia		Valores de AIC Oveja E Vía SC, Modelo BiCompartmental Con Tiempo de Latencia	
AIC 1/Y	197,78	AIC 1/Y	199,23
AIC 1/Yat	115,52	AIC 1/Yat	-
AIC 1/Y*Y	154,34	AIC 1/Y*Y	149,54
AIC 1/Yat*Yat	12,12	AIC 1/Yat*Yat	-4,96

TABLA 18.- Valores de AIC obtenidos tras ajustar las concentraciones plasmáticas experimentales de danofloxacino en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2%, a una dosis de a 18 mg/kg y administración subcutánea, a los distintos modelos farmacocinéticos.

Los parámetros correspondientes al ajuste para cada animal, valores medios y estadísticos asociados, se presentan en la Tabla 19. En la Tabla 20 se muestran los parámetros correspondientes al análisis no compartimental.

Parámetros	Oveja A	Oveja B	Oveja C	Oveja D	Oveja E	MEDIA	SD	CV
$C_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{g/L}$)	3908,09	3065,70	2745,22	2673,14	3047,28	3087,89	491,00	15,90
$T_{m\acute{a}x}$ (h)	2,81	2,90	2,42	3,01	3,03	2,84	0,25	8,79
C_1 ($\mu\text{g/L}$)	94665,34	47428,36	40398,18	85631,15	58437,69	65312,14	23781,64	36,41
C_z ($\mu\text{g/L}$)	246,98	372,66	127,91	301,89	334,79	276,84	95,18	34,38
C_a ($\mu\text{g/L}$)	94912,32	47801,02	40526,08	85661,34	58772,47	65534,65	23736,93	36,22
λ_1 (1/h)	0,34	0,33	0,38	0,32	0,32	0,34	0,03	8,07
λ_z (1/h)	0,05	0,07	0,05	0,04	0,06	0,05	0,01	20,31
k_a (1/h)	0,38	0,38	0,46	0,35	0,36	0,39	0,04	11,05
$t_{1/2\lambda_1}$ (h)*	2,03	2,13	1,81	2,17	2,20	2,07	0,16	7,52
$t_{1/2\lambda_z}$ (h)*	13,44	10,50	14,43	17,83	11,27	13,49	2,90	21,47
$t_{1/2\lambda_a}$ (h)*	1,82	1,80	1,52	2,00	1,92	1,81	0,18	10,11
Vd (L/Kg)	2,76	3,47	4,36	3,08	3,43	3,42	0,60	17,56
Cl (L/h/Kg)	0,55	0,67	0,908	0,80	0,65	0,72	0,14	19,54

TABLA 19.- Parámetros farmacocinéticos bicompartimentales obtenidos tras la administración subcutánea de danofloxacino en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2%, a dosis de 18 mg/kg, a cada una de las ovejas a partir de sus correspondientes ecuaciones de ajuste junto con sus valores medios y estadísticos de desviación.

Parámetros	Oveja A	Oveja B	Oveja C	Oveja D	Oveja E	MEDIA	SD	CV
AUC_{0-24} ($\mu\text{g}\times\text{h/L}$)	35837,87	25361,76	17265,24	25183,41	29802,01	26690,06	6823,27	25,56
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\times\text{h/L}$)	37278,49	26576,64	18109,90	25548,46	31131,16	27728,93	7095,37	25,59
MRT (h)	7,20	7,78	7,28	5,90	7,50	7,13	0,72	10,11
MAT (h)	4,03	4,97	4,81	2,87	4,73	4,28	0,88	20,47
Cl/F (L/kg/h)	0,48	0,68	0,99	0,70	0,58	0,69	0,19	28,00
Vz/F (L/kg)	7,58	9,38	20,22	9,88	7,77	10,96	5,27	48,05
F (%)	126,56	69,17	71,16	74,73	105,03	89,33	25,41	28,44

TABLA 20.- Parámetros farmacocinéticos no compartimentales deducidos tras la administración subcutánea de danofloxacino en solución del polímero P407 al 25% más

carboximetilcelulosa al 2%, a dosis de 18 mg/kg, a cada una de las ovejas junto con sus valores medios y estadísticos de desviación.

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

Una vez obtenidos los valores medios de los principales parámetros farmacocinéticos, compartimentales y no compartimentales de danofloxacino tras la administración intravenosa de una dosis de 6 mg/kg (IV) y subcutánea (SC), y subcutáneas de 18 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% (SC2), se resumen en la Tabla 21.

En el Gráfico 9 se representan en escala semilogarítmica los valores experimentales medios (\pm SD) de concentración obtenidos a los distintos tiempos de extracción tras la administración de danofloxacino por las vías IV, SC, SC1 y SC2. En el Gráfico 10 se han representado también, en escala semilogarítmica, los valores medios (\pm SD) de las tres administraciones subcutáneas.

Parámetros compartimentales	IV	SC	SC1	SC2
λ_z (1/h)	0,18	0,14	0,07	0,05
$t_{1/2\lambda_z}$ (h) *	3,87	5,18	10,27	13,49
k_a (1/h)	-	1,36	0,45	0,39
$t_{1/2k_a}$ (h) *	-	0,52	1,58	1,81
C_{max} ($\mu\text{g/L}$)	-	1709,57	2537,42	3087,89
T_{max} (h)	-	2,78	2,56	2,84
V_{ss} (L/Kg)	1,79			
V_d (L/Kg)	1,79	1,86	3,65	3,43
Cl (L/h/Kg)	0,62	0,55	0,98	0,72
Parámetros No compartimentales				
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\times\text{h/L}$)	10465,13	10636,59	21628,83	27728,93
MRT (h)	2,85	5,23	5,45	7,13
MAT (h)	-	2,38	2,59	4,28
V_{ss} (L/kg)	1,66	-	-	-
V_z/F (L/kg)	-	3,72	10,87	10,96
Cl/F (L/kg/h)	-	0,57	0,98	0,69
F (%)	-	104,16	69,52	89,33

TABLA 21.- Valores medios de los principales parámetros farmacocinéticos en plasma tras la administración de una dosis de 6 mg/kg de danofloxacino por vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC), y una dosis de 18 mg/kg de danofloxacino por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y subcutánea en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% (SC2).

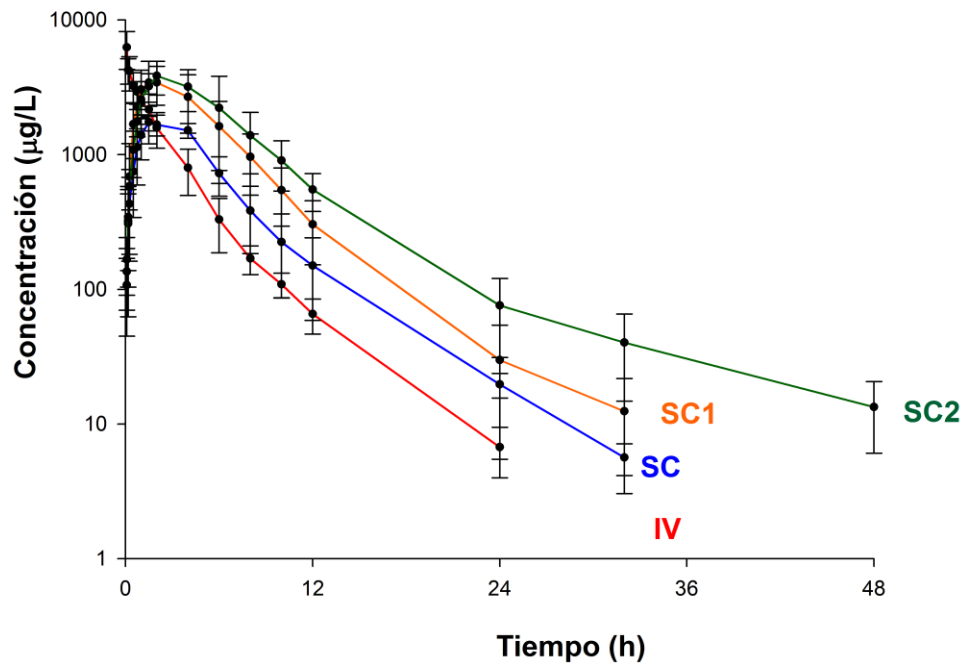


Gráfico 9.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de danofloxacino obtenidas tras la administración de una dosis de 6 mg/kg vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC), y una dosis de 18 mg/kg de danofloxacino por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y subcutánea en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a ovejas.

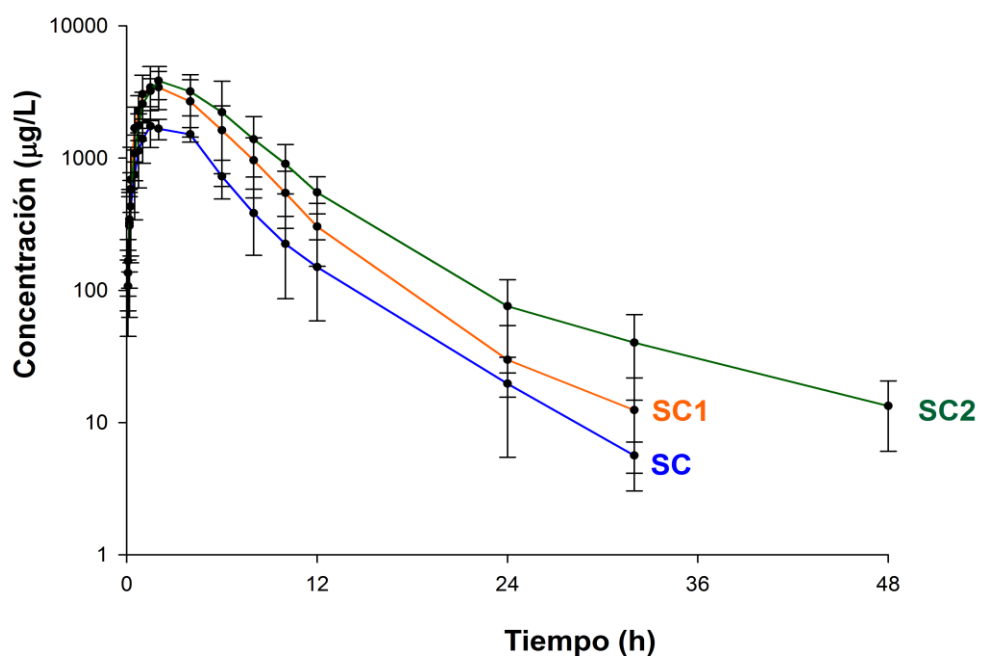


Gráfico 10.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de danofloxacino obtenidas tras la administración de una dosis

de 6 mg/kg por vía subcutánea (SC), 18 mg/kg por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a ovejas.

Para saber si existen o no diferencias significativas entre las diferentes vías de administración del fármaco, y los animales utilizados, se han realizado dos estudios estadísticos no paramétricos. El primero de ellos es la prueba de Kruskal-Wallis que evalúa la hipótesis de que los valores de cada parámetro farmacocinético, dentro de cada una de las vías de administración, en todos los animales, son iguales o diferentes. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 22.

Parámetros	P Todas las vías	P Extravasculares	Parámetros	P Todas las vías	P Extravasculares
λ_z (1/h)	0,001*	-	Vz/F	-	0,009*
$t_{1/2\lambda_z}$ (h)	0,001*	-	Cl (L/h/Kg)	0,079	0,013*
k_a (1/h)	-	0,004*	Cl/F	-	0,015*
$t_{1/2k_a}$ (h)	-	0,005*	AUC _{0-∞} (μg×h/L)	0,002*	0,006*
C _{max} (μg/L)	-	0,004*	MRT (h)	0,002*	-
T _{max} (h)	-	0,018*	MAT (h)	-	0,006*
Vd(L/Kg)	-	0,008*	F (%)	-	0,022*

TABLA 22.-Estudio comparativo no paramétrico (Kruskal-Wallis) entre los principales parámetros farmacocinéticos compartimentales y no compartimentales obtenidos tras la administración de una dosis de 6 mg/kg de danofloxacino por vía intravenosa (IV) y vía subcutánea (SC) y 18 mg/kg por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y subcutánea en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a ovejas.

(*P<0,05: diferencias significativas; P>0,05: diferencias no significativas)

Dicha prueba revela la existencia de diferencias significativas, para todas las vías, en la semivida de eliminación en la fase terminal ($t_{1/2\lambda_z}$), en constante de disposición lenta (λ_z), en el área bajo la curva de concentración plasmática a tiempo infinito (AUC_{0-∞}) y en el tiempo medio de residencia (MRT).

La comparación entre las tres administraciones por vía extravascular (SC, SC1 y SC2), pone de manifiesto diferencias significativas ($P < 0,05$) para todos sus parámetros farmacocinéticos.

El segundo estudio estadístico no paramétrico realizado es la prueba U de Mann-Whitney para dos muestras independientes. Esta prueba se realiza sobre aquellos parámetros que han mostrado diferencias significativas en la prueba de Kruskal-Wallis.

La prueba U de Mann-Whitney evalúa la hipótesis de que los valores de cada parámetro, comparados entre dos vías de administración, en todos los animales, son iguales o diferentes. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 23.

Parámetros	$P_{SC/IV}$	$P_{SC1/IV}$	$P_{SC2/IV}$	$P_{SC1/SC}$	$P_{SC2/SC}$	$P_{SC1/SC2}$
λ_z (1/h)	0,036*	0,009*	0,009*	0,009*	0,009*	0,160
$t_{1/2 \lambda_z}$ (h)	0,028*	0,009*	0,009*	0,009*	0,009*	0,251
k_a (1/h)	---	---	---	0,009*	0,009*	0,071
$t_{1/2 ka}$ (h)	---	---	---	0,009*	0,009*	0,094
T_{max} (h)	---	---	---	0,076	0,016*	0,076
Vd (L/Kg)	---	---	---	0,009*	0,009*	0,917
Vz/F	---	---	---	0,009*	0,009*	0,754
Cl (L/h/Kg)	0,841	0,008*	0,548	0,008*	0,293	0,028*
Cl/F	---	---	---	0,008*	0,293	0,028*
AUC _{0-∞} ($\mu\text{g} \times \text{h/L}$)	0,754	0,009*	0,009*	0,009*	0,009*	0,175
MRT (h)	0,008*	0,009*	0,009*	0,602	0,016*	0,028*
MAT (h)	---	---	---	0,421	0,016*	0,032*
F (%)				0,008*	0,008*	0,222

TABLA 23.- Estudio comparativo no paramétrico (U de Man-Whitney) entre los principales parámetros farmacocinéticos compartimentales y no compartimentales obtenidos tras la administración de una dosis de 6 mg/kg de danofloxacino por vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC) y 18 mg/kg de danofloxacino por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y subcutánea en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a ovejas.

(* $P < 0,05$: diferencias significativas; $P > 0,05$: diferencias no significativas).

Ante los valores obtenidos con dicha prueba se presentan los siguientes resultados:

- Al comparar las vías extravasculares respecto la vía intravenosa: para relación SC/IV se observan diferencias significativas para los parámetros λ_z , $t_{1/2} \lambda_z$ y MRT. Para la relación SC1/IV han aparecido diferencias significativas en todos los parámetros. De igual manera a sucedido en la relación SC2/IV, salvo en el aclaramiento (Cl).
- Al comparar las formulaciones extravasculares poliméricas con la formulación extravascular convencional: las relaciones SC1/SC han mostrado diferencias significativas en todos los parámetros salvo en tres, Tmax, MRT y MAT. En la relación SC2/SC todos los parámetros han mostrado diferencias significativas salvo el aclaramiento.
- Al comparar las formulaciones extravasculares poliméricas entre sí se observan diferencias significativas en tres parámetros: aclaramiento, MRT y MAT.

4.6.- EXCRECIÓN EN LECHE DE DANOFLOXACINO TRAS SU ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA

En la Tabla 24 se muestran las concentraciones experimentales de danofloxacino, obtenidas en la leche de las ovejas tratadas con una dosis intravenosa de 6 mg/kg de peso.

Tiempo (h)	Oveja A	Oveja B	Oveja C	Oveja D	Oveja E	MEDIA	SD	CV
1	17147,32	36157,89	8642,18	27165,18	25230,43	22868,60	10437,53	45,64
2	22681,01	42678,27	13501,34	32269,65	32542,65	28734,58	11069,35	38,52
4	16861,10	29200,62	11548,91	31211,18	23986,27	22561,61	8286,99	36,73
6	5974,76	6389,17	4659,86	13782,70	8715,03	7904,30	3597,15	45,51
8	2504,62	3684,21	909,70	6931,39	4717,84	3749,55	2273,79	60,64
10	1225,96	2879,58	541,13	1950,19	1413,25	1602,02	874,06	54,56
12	684,45	1395,88	279,25	406,16	996,54	752,46	453,33	60,25
24	50,41	83,99	19,62	133,09	72,10	71,84	42,09	58,58
32	19,49	32,89	14,95	45,45	26,24	27,81	11,98	43,08
48	5,96	14,10	7,29	17,37	10,97	11,14	4,72	42,42

TABLA 24.- Concentraciones experimentales de danofloxacino excretadas en leche, expresadas en $\mu\text{g/L}$, en cada oveja tras la administración intravenosa de una dosis de 6 mg/kg junto con sus estadísticos asociados.

Como se puede observar, las concentraciones del fármaco son detectables hasta las 48 horas. Este hecho se refleja en el Gráfico 11 de las representaciones semilogarítmicas de las concentraciones correspondientes a cada animal. En el gráfico 12 se representan los valores de concentración promediados en escala semilogarítmica.

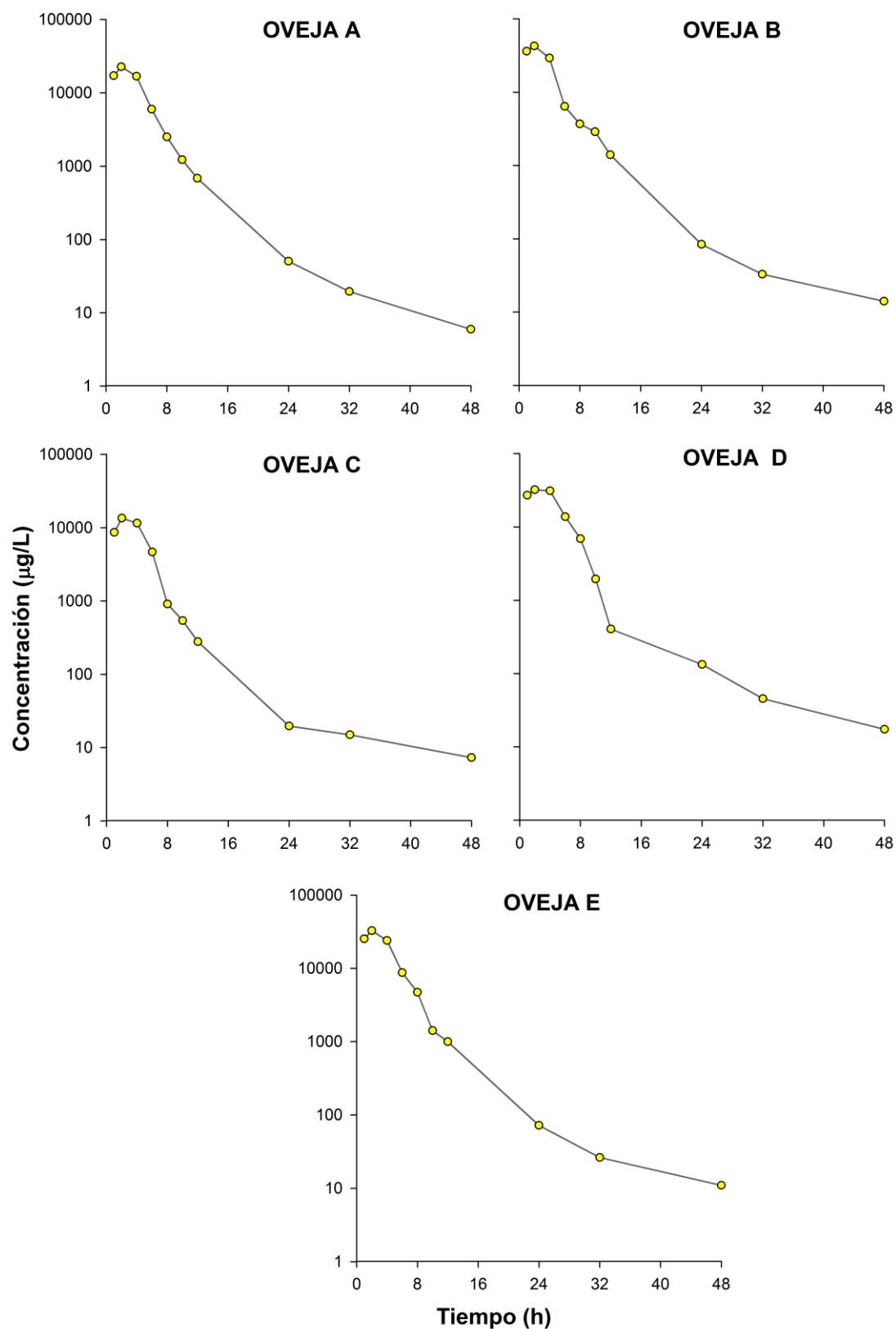


Gráfico 11.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones experimentales de danofloxacino obtenidas en leche tras la administración de una dosis de 6 mg/kg vía intravenosa a ovejas.

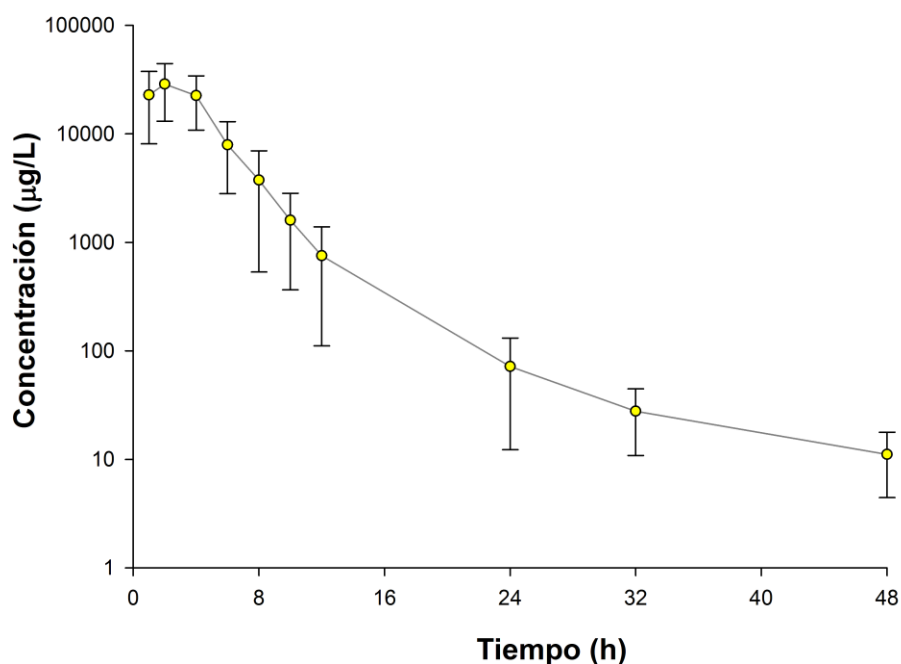


Gráfico 12.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de danofloxacino excretadas en leche tras la administración de una dosis de 6 mg/kg vía intravenosa (IV) en ovejas.

La homogeneidad de los datos ha sido comprobada mediante el test de Lavene (Tabla 25).

Pruebas de Homogeneidad de Varianzas para la Concentración		
Prueba de Levene para Concentración por Tiempo	Valor-P*	<0,001*
Prueba de Levene para Concentración por Animales	Valor-P*	0,078

TABLA 25.- Prueba de Levene para las concentraciones plasmáticas de danofloxacino excretadas en leche, tras la administración de una dosis intravenosa de 6 mg/kg a ovejas.

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

A continuación, en la Tabla 26, se muestran las cantidades de danofloxacino, en microgramos, excretadas en leche para cada oveja, a los diferentes tiempos de ordeño, tras la administración intravenosa de 6 mg/kg de peso, junto con los estadísticos de desviación correspondientes.

Tiempo (h)	Oveja A	Oveja B	Oveja C	Oveja D	Oveja E	MEDIA	SD	CV
1	943,10	470,05	1296,33	4074,78	5676,85	2492,22	2267,46	90,98
2	952,60	1066,96	2025,20	2258,88	2766,13	1813,95	782,49	43,14
4	2529,16	730,02	1732,34	1716,61	1079,38	1557,50	691,62	44,41
6	2539,27	990,32	1491,16	4134,81	1786,58	2188,43	1224,20	55,94
8	137,75	165,79	122,81	901,08	589,73	383,43	348,63	90,92
10	612,98	1583,77	151,52	243,77	346,25	587,66	583,02	99,21
12	205,33	314,07	51,66	36,55	134,53	148,43	114,84	77,37
24	88,73	39,89	29,43	138,41	72,10	73,71	43,36	58,82
32	18,32	26,32	13,46	27,27	13,12	19,70	6,81	34,55
48	15,61	19,74	16,33	30,92	20,40	20,60	6,13	29,77

TABLA 26.- Cantidad en microgramos de danofloxacino excretado en leche tras la administración intravenosa de una dosis de 6 mg/kg junto con sus estadísticos de desviación.

Los valores de concentración en leche obtenidos para cada oveja han sido sometidos a análisis no compartimental. En la Tabla 27 aparecen los parámetros calculados junto con sus valores medios y estadísticos de desviación. Además, se muestran los ratios $AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{plasma}}$, $C_{\text{máx-leche}}/C_{\text{máx-plasma}}$ obtenidos a partir de parámetros farmacocinéticos no compartimentales y 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	Oveja A	Oveja B	Oveja C	Oveja D	Oveja E	MEDIA	SD	CV
C_{max} ($\mu\text{g/L}$)	22681,01	42678,27	13501,34	32269,65	32542,65	28734,58	11069,35	38,52
$T_{m\acute{a}x}$ (h)	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	0,00	0,00
$AUC(\mu\text{g}\times\text{h/L})$	105066,55	184605,04	63548,22	182117,12	152882,66	137643,92	52361,46	38,04
MRT (h)	4,06	3,93	4,11	4,29	4,11	4,10	0,13	3,14
$AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{plasma}}$	10,70	14,41	7,49	15,98	15,47	12,81	3,62	28,27
$C_{m\acute{a}x\text{-leche}}/C_{m\acute{a}x\text{-plasma}}$	4,44	5,31	1,87	6,78	5,28	4,73	1,81	38,22
% excreción	1,74	1,11	1,19	2,13	2,89	1,81	0,73	40,39

TABLA 27.- Parámetros farmacocinéticos no compartimentales obtenidos de la leche tras la administración intravenosa de danofloxacino, a dosis de 6 mg/kg, a cada una de las ovejas junto con sus estadísticos de desviación.

En el Gráfico 14 se representa, en escala semilogarítmica, las concentraciones promediadas ($\text{media} \pm \text{SD}$) detectadas en plasma y en leche, tras la administración intravenosa de una dosis de 6 mg/kg de danofloxacino. En el Gráfico 13 se representan sus respectivos valores individuales.

En los Gráficos 13 y 14 puede observarse como las concentraciones en leche de danofloxacino son superiores a las plasmáticas a lo largo de todo el periodo de estudio.

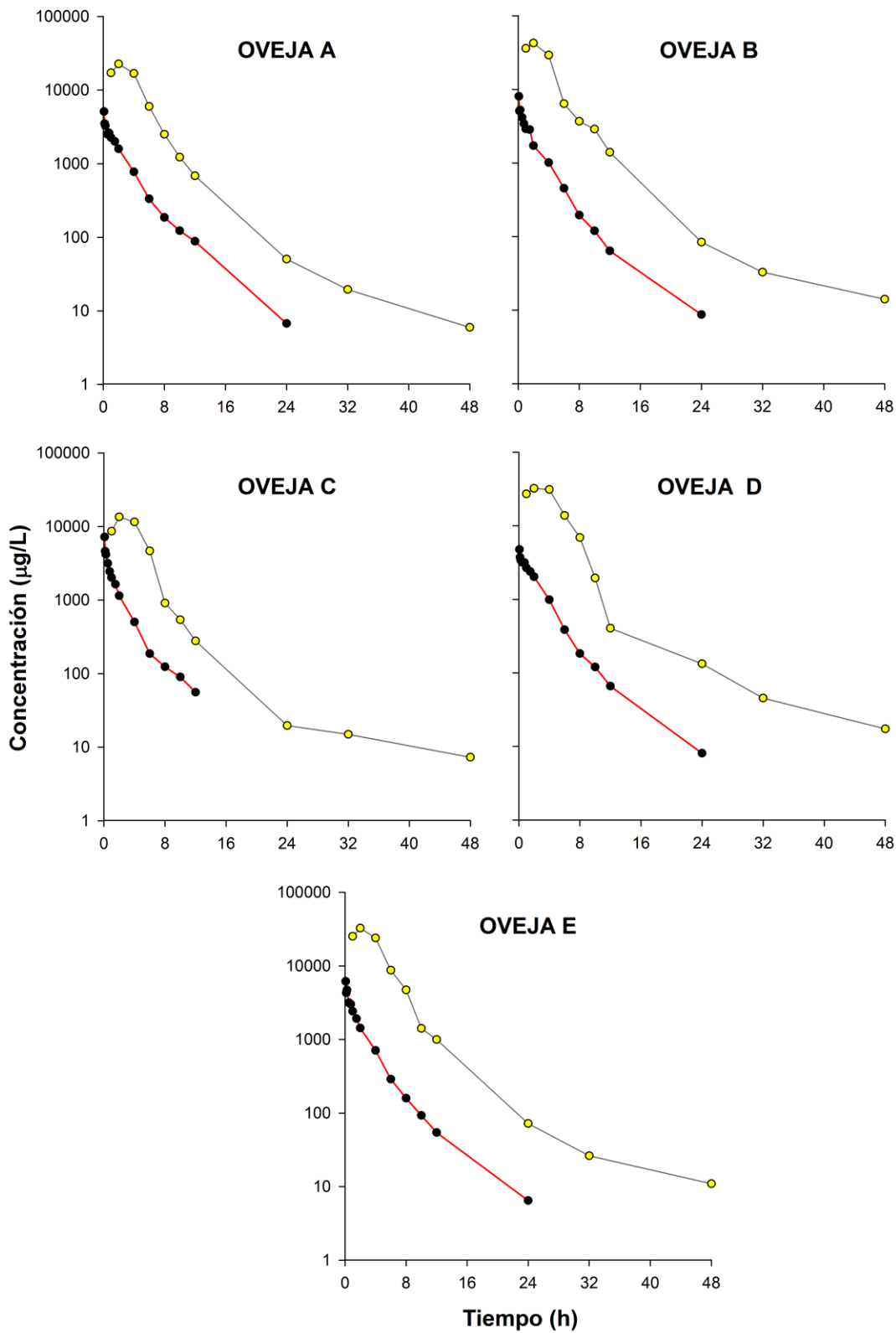


Gráfico.13 Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones plasmáticas experimentales de danofloxacino (*línea roja*), y las concentraciones experimentales

detectadas en leche (*línea gris*), obtenidas tras la administración intravenosa de una dosis de 6 mg/kg a cada oveja por vía intravenosa.

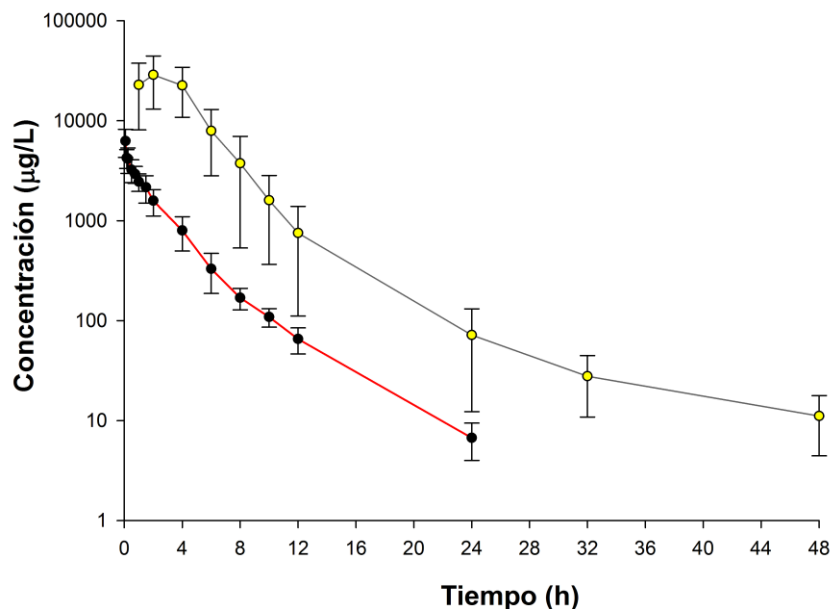


Gráfico 14.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de danofloxacino obtenidas en leche (*línea gris*), y en plasma (*línea roja*), tras la administración intravenosa de una dosis de 6 mg/kg.

4.7.- EXCRECIÓN EN LECHE DE DANOFLOXACINO TRAS SU ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA

En la siguiente tabla se muestran las concentraciones experimentales de danofloxacino en la leche de las ovejas a las que se les administró una dosis subcutánea de 6 mg/kg de peso, junto con sus estadísticos correspondientes (Tabla 28).

Tiempo (h)	Oveja A	Oveja B	Oveja C	Oveja D	Oveja E	MEDIA	SD	CV
1	3605,77	6785,71	8319,58	3692,31	2173,91	4915,46	2540,34	51,68
2	17963,29	13205,13	25816,99	18161,43	6947,56	16418,88	6960,25	42,39
4	12259,62	17291,18	24478,49	24855,04	15793,61	18935,59	5543,20	29,27
6	12130,18	8595,64	12492,31	15220,56	14763,29	12640,39	2636,58	20,86
8	7546,25	5632,79	10005,78	9379,22	13043,48	9121,50	2778,61	30,46
10	6355,23	2369,67	3937,73	4212,45	11546,69	5684,35	3571,46	62,83
12	4671,67	1625,46	1523,95	3866,50	7650,27	3867,57	2523,64	65,25
24	351,33	106,93	106,42	128,74	819,16	302,51	306,68	101,38
32	121,82	102,04	56,15	56,75	120,77	91,51	32,96	36,02
48	14,36	10,00	16,33	15,24	29,43	17,07	7,32	42,84

TABLA 28.- Concentraciones experimentales de danofloxacino excretadas en leche, expresadas en $\mu\text{g/L}$, en cada oveja tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg junto con sus estadísticos asociados.

Se observa como las concentraciones del fármaco en leche son detectables hasta las 48 horas en todos los casos. Los gráficos 15 y 16 representan, en escala semilogarítmica, las concentraciones determinadas en leche para cada oveja, y el valor promedio calculado (\pm S.D.) respectivamente.

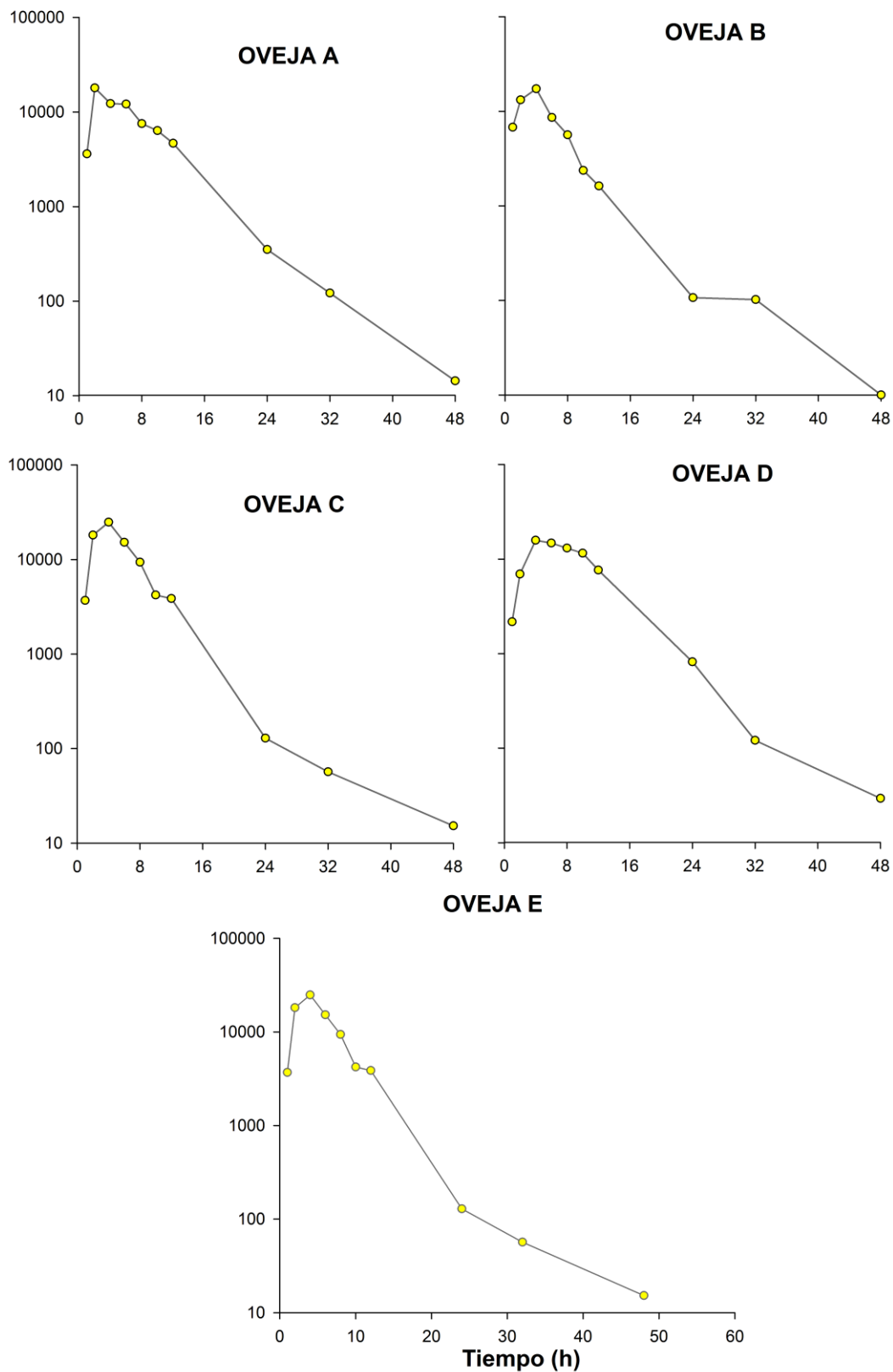


Gráfico 15.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones experimentales de danofloxacino obtenidas en leche tras la administración de una dosis de 6 mg/kg vía subcutánea.

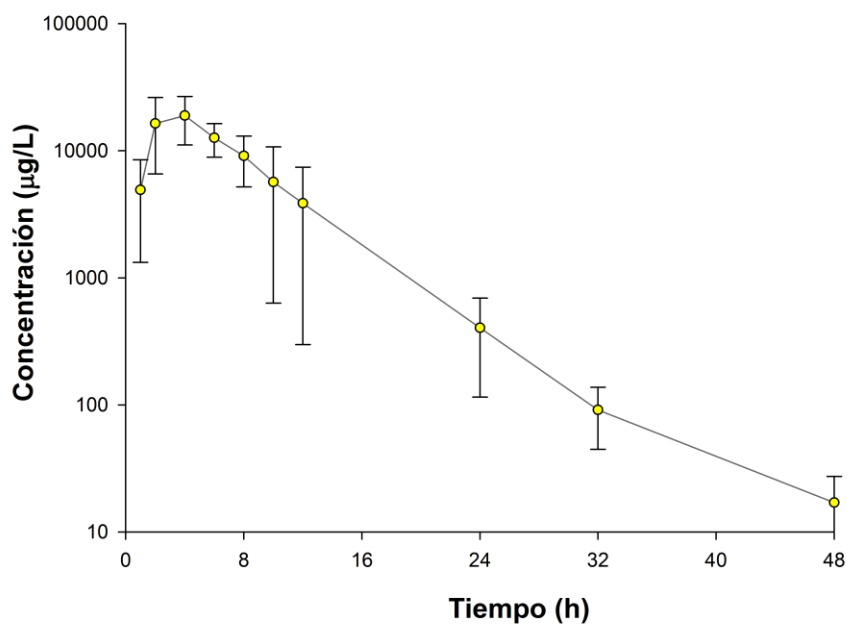


Gráfico 16.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de danofloxacino excretadas en leche tras la administración de una dosis de 6 mg/kg vía subcutánea (SC).

La homogeneidad de los datos se ha comprobado mediante la prueba de Levene (Tabla 29).

Pruebas de Homogeneidad de Varianzas para la Concentración		
Prueba de Levene para Concentración por Tiempo	Valor-P*	<0,001*
Prueba de Levene para Concentración por Animales	Valor-P*	0,331

TABLA 29.- Prueba de Levene para las concentraciones plasmáticas de danofloxacino excretadas en leche, tras la administración de una dosis subcutánea de 18 mg/kg a ovejas.

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

En la Tabla 30 se muestran las cantidades de danofloxacino, en microgramos, excretadas en leche para cada oveja y tiempo de ordeño, junto con los valores medios y sus estadísticos de desviación.

Tiempo (h)	Oveja A	Oveja B	Oveja C	Oveja D	Oveja E	MEDIA	SD	CV
1	270,43	695,54	748,76	332,31	336,96	476,80	226,29	47,46
2	934,09	1327,12	5292,48	454,04	833,71	1768,29	1994,44	112,79
4	122,60	778,10	1101,53	621,38	1579,36	840,59	543,45	64,65
6	667,16	1293,64	2623,38	4109,55	989,14	1936,58	1424,42	73,55
8	490,51	887,16	2301,33	1688,26	2021,74	1477,80	765,17	51,78
10	349,54	334,72	767,86	589,74	2020,67	812,50	698,91	86,02
12	116,79	123,94	76,20	579,98	612,02	301,79	269,43	89,28
24	114,18	76,59	100,03	123,59	524,26	187,73	188,96	100,65
32	15,23	44,01	33,69	34,05	48,31	35,06	12,76	36,41
48	10,92	12,35	22,87	26,23	31,20	20,71	8,82	42,57

TABLA 30.- Cantidad de danofloxacino excretada en leche, en microgramos tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg junto con sus estadísticos de desviación.

En la Tabla 31 se muestran los parámetros farmacocinéticos no compartimentales obtenidos en leche tras la administración subcutánea de danofloxacino 6 mg/kg peso en ovejas. Son los mismos que los detallados para la vía intravenosa y además se han calculado los ratios $AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{plasma}}$, $C_{\text{máx-leche}}/C_{\text{máx-plasma}}$ y el porcentaje de excreción en leche.

Parámetros	Oveja A	Oveja B	Oveja C	Oveja D	Oveja E	MEDIA	SD	CV
$C_{\text{max}} (\mu\text{g/L})$	17963,29	17291,18	25816,99	24855,04	15793,61	20344,02	4636,72	22,79
$T_{\text{máx}} (h)$	2,00	4,00	2,00	4,00	4,00	3,20	1,10	34,23
$AUC (\mu\text{g}\times h/L)$	130996,88	100968,77	154044,81	153377,87	166885,49	141254,76	25959,94	18,38
$MRT (h)$	7,53	5,86	5,37	6,27	9,24	6,85	1,56	22,71
$AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{plasma}}$	10,79	9,37	14,04	17,82	15,61	13,53	3,46	25,55
$C_{\text{máx-leche}}/C_{\text{máx-plasma}}$	9,66	9,16	13,38	16,23	11,80	12,04	2,89	23,96
% excreción	0,67	1,15	2,25	1,35	2,08	1,50	0,66	43,95

TABLA 31.- Parámetros farmacocinéticos no compartimentales de la leche tras la administración subcutánea de danofloxacino, a dosis de 6 mg/kg, a cada una de las ovejas junto con sus estadísticos de desviación.

A continuación se representan, en escala semilogarítmica, las concentraciones experimentales detectadas en plasma y en leche para cada animal, tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg de danofloxacino (Gráfico 17). En el gráfico 18 se representan sus respectivos valores promediados (media \pm SD).

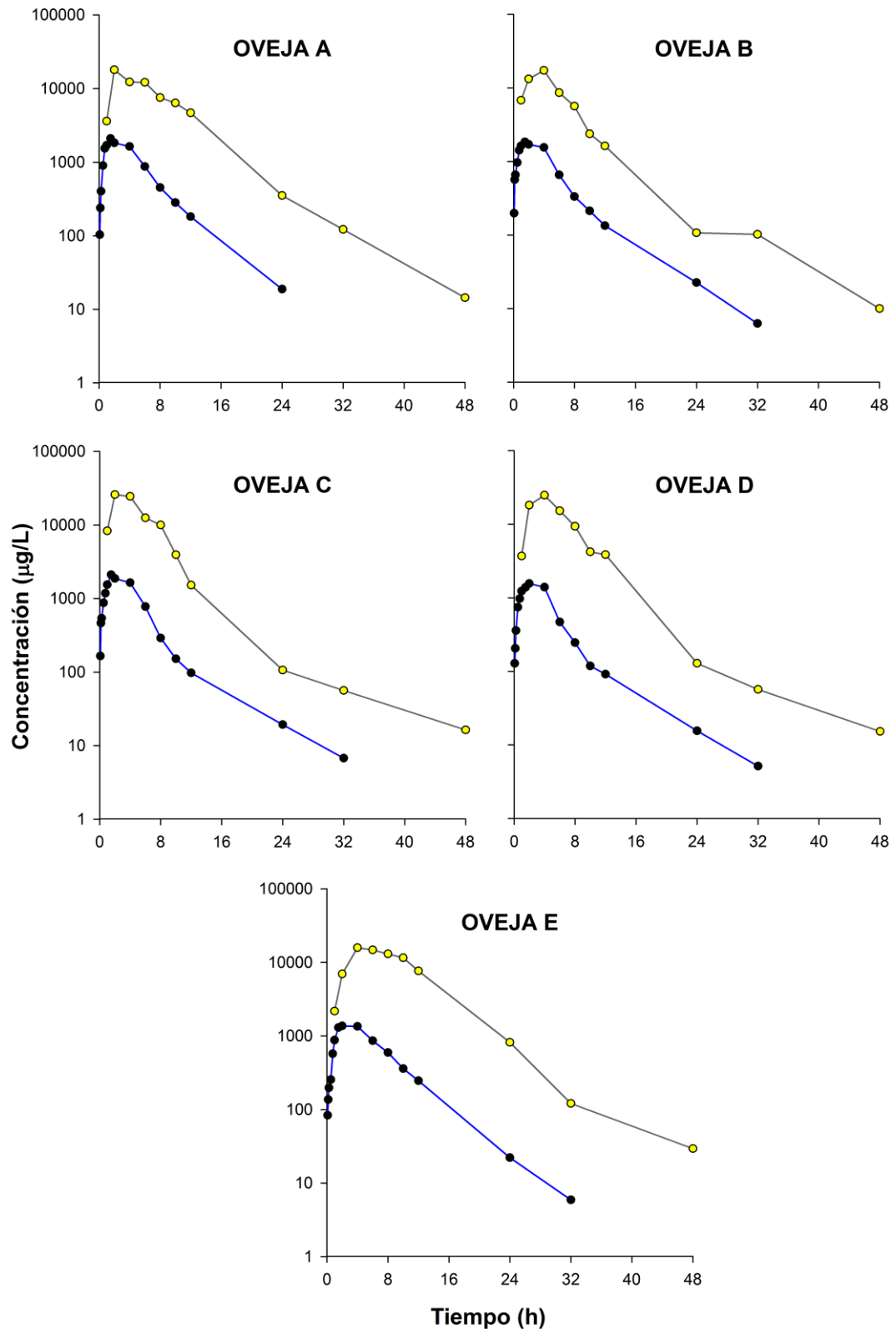


Gráfico.17 Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones plasmáticas experimentales de danofloxacin (*línea azul*), y las concentraciones experimentales

detectadas en leche (*línea gris*), obtenidas tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg a cada animal.

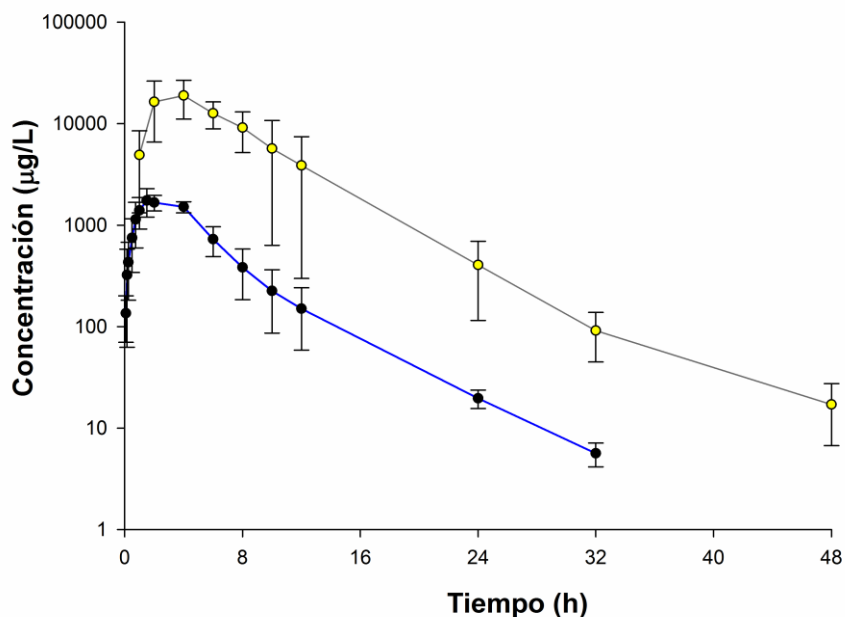


Gráfico 18- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de danofloxacino obtenidas en plasma (*línea azul*), y en leche (*línea gris*), tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg a ovejas.

Como podemos observar en el Gráfico 17 y 18, las concentraciones en leche de danofloxacino están muy por encima de las plasmáticas y se mantiene así durante todo el periodo de estudio.

4.8.- EXCRECIÓN EN LECHE DE DANOFLOXACINO TRAS SU ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA CON SOLUCIÓN DEL POLÍMERO P407 AL 25%.

Tras la administración subcutánea de una dosis de 18 mg/kg de peso de danofloxacino en solución del polímero P407 al 25%, se obtuvieron unas concentraciones experimentales que se muestran en la Tabla 32. En ella parecen también los valores medios de concentración en leche y sus estadísticos de desviación.

Tiempo (h)	Oveja A	Oveja B	Oveja C	Oveja D	Oveja E	MEDIA	SD	CV
1	7171,82	973,53	14652,37	19711,93	79053,50	24312,63	31422,80	129,24
2	26654,06	28466,82	35062,36	28049,73	22151,00	28076,79	4639,24	16,52
4	27204,39	34307,07	34856,63	46225,61	24313,02	33381,34	8491,14	25,44
6	18142,50	25689,57	16690,31	40892,53	19536,02	24190,19	9946,11	41,12
8	12635,87	21661,95	8878,97	27810,08	13740,46	16945,46	7651,77	45,16
10	7796,82	14051,99	4765,33	25381,26	7287,16	11856,51	8297,35	69,98
12	5603,86	11422,25	2641,98	12406,27	6036,75	7622,22	4144,81	54,38
24	261,88	481,68	129,80	1175,21	728,60	555,44	414,39	74,61
32	73,59	241,18	93,63	530,79	404,04	268,65	197,79	73,62
48	28,48	33,35	17,42	78,85	68,63	45,35	26,80	59,10
72	14,93	12,08	7,29	47,51	59,03	28,17	23,44	83,20

TABLA 32.- Concentraciones experimentales de danofloxacino excretadas en leche, expresadas en $\mu\text{g/L}$, en cada oveja tras la administración subcutánea de una dosis de 18 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% junto con sus estadísticos de desviación.

la homogeneidad de los datos se ha verificado mediante la prueba de Levene (Tabla 33).

Pruebas de Homogeneidad de Varianzas para la Concentración		
Prueba de Levene para Concentración por Tiempo	Valor-P*	<0,001*
Prueba de Levene para Concentración por Animales	Valor-P*	0,506

TABLA 33.- Prueba de Levene para las concentraciones plasmáticas de danofloxacino excretadas en leche tras la administración de una dosis subcutánea de de 18 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% a ovejas.

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

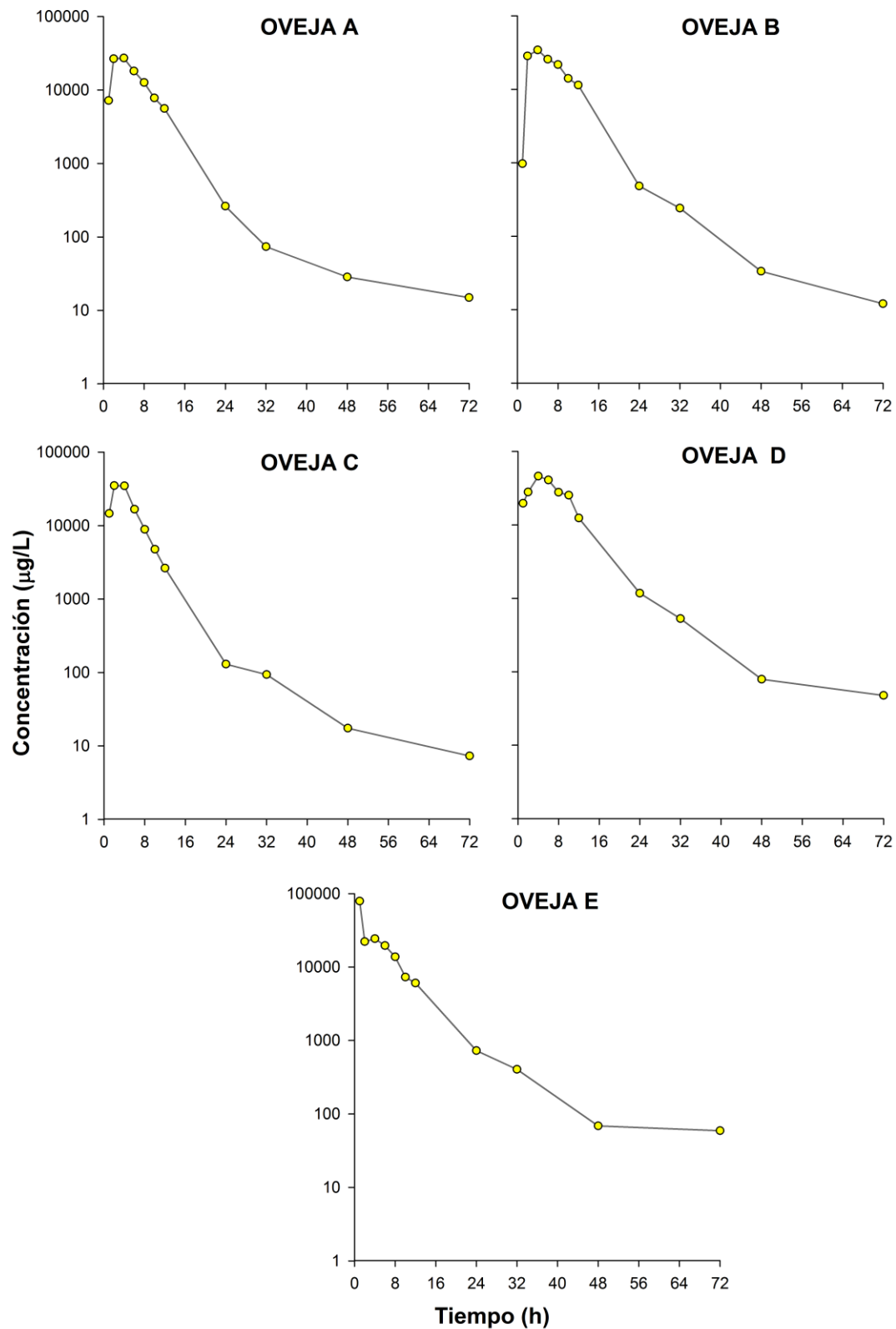


Gráfico.19 Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones detectadas en leche, para cada oveja, tras la administración subcutánea de danofloxacino en solución del polímero P407 al 25%, a la dosis de 18 mg/kg.

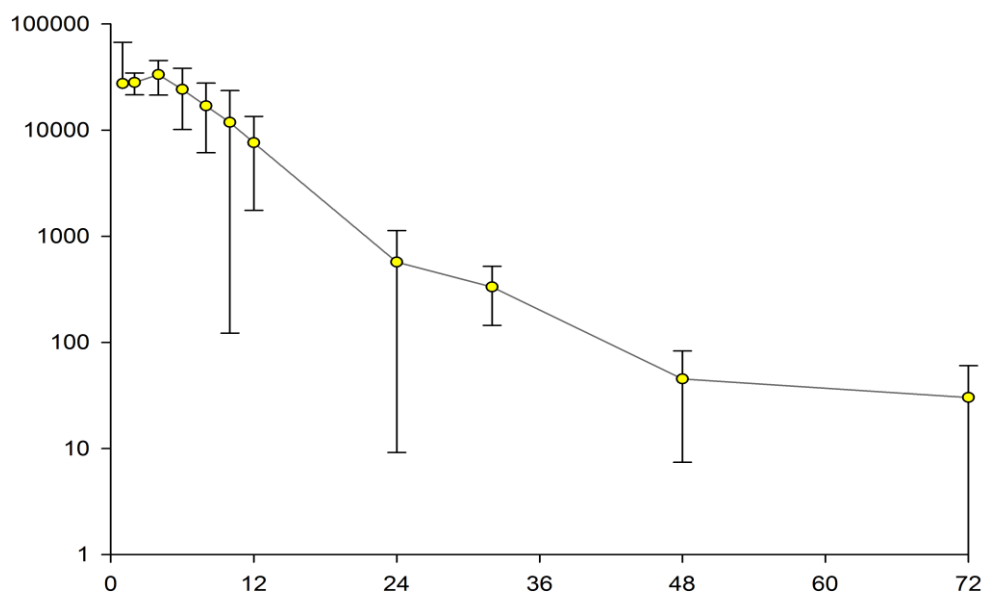


Gráfico 20.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de danofloxacino excretadas en leche tras la administración de una dosis de 18 mg/kg vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) en ovejas.

En la Tabla 34 se muestran las cantidades de danofloxacino, en microgramos, excretadas en leche para cada animal, en los diferentes tiempos de ordeño, tras la administración subcutánea de 18 mg/kg de peso en solución del polímero P407 al 25% junto con sus valores promedio y sus estadísticos de desviación.

Tiempo (h)	Oveja A	Oveja B	Oveja C	Oveja D	Oveja E	MEDIA	SD	CV
1	329,90	77,88	2344,38	1478,40	4743,21	1794,75	1883,41	104,94
2	4397,92	711,67	5084,04	841,49	1506,27	2508,28	2074,57	82,71
4	7018,73	5317,60	6448,48	3466,92	3039,13	5058,17	1764,42	34,88
6	12179,01	6499,46	4005,67	13903,46	7032,97	8724,11	4148,33	47,55
8	5243,89	2274,50	1953,37	3754,36	4671,76	3579,58	1444,05	40,34
10	2572,95	1615,98	2072,92	6345,32	1603,17	2842,07	1998,43	70,32
12	1232,85	628,22	39,63	1860,94	633,86	879,10	692,27	78,75
24	335,21	578,02	220,66	1439,64	765,03	667,71	480,57	71,97
32	95,67	108,53	60,39	246,82	242,42	150,77	87,48	58,03
48	67,21	42,02	36,24	113,55	126,62	77,13	41,17	53,37
72	32,92	15,70	14,72	74,12	102,71	48,03	38,90	80,99

TABLA 34.- Cantidad de danofloxacino excretada en leche, en μg , tras la administración subcutánea de una dosis de 18 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% junto con sus valores promedio y sus estadísticos de desviación.

En la Tabla 35 se presentan los parámetros farmacocinéticos no compartimentales obtenidos en cada oveja, y sus promedios y estadísticos de desviación, junto con los ratios $\text{AUC}_{\text{leche}}/\text{AUC}_{\text{plasma}}$, $\text{C}_{\text{máx-leche}}/\text{C}_{\text{máx-plasma}}$ y el porcentaje de excreción.

Parámetros	Oveja A	Oveja B	Oveja C	Oveja D	Oveja E	MEDIA	SD	CV
$C_{\text{max}} (\mu\text{g/L})$	27204,39	34307,07	35062,36	46225,61	79053,50	44370,58	20548,37	46,31
$T_{\text{máx}} (h)$	4,00	4,00	2,00	4,00	1,00	3,00	1,41	47,14
$\text{AUC} (\mu\text{g}\times\text{h/L})$	203792,33	286817,25	206617,08	206617,08	409478,17	262664,38	89283,49	33,99
$\text{MRT} (h)$	6,84	7,76	5,30	8,50	9,06	7,49	1,48	19,75
$\text{AUC}_{\text{leche}}/\text{AUC}_{\text{plasma}}$	20,76	22,39	24,36	18,13	41,45	25,42	9,25	36,38
$\text{C}_{\text{máx-leche}}/\text{C}_{\text{máx-plasma}}$	10,93	15,59	12,17	22,04	26,20	17,38	6,55	37,66
% excreción	2,42	1,23	1,28	1,76	1,89	1,71	0,49	28,56

TABLA 35.- Parámetros farmacocinéticos no compartimentales, obtenidos para la leche, deducidos tras la administración subcutánea de danofloxacino en solución del polímero P407 al 25%, a dosis de 18 mg/kg, a cada una de las ovejas junto con sus estadísticos de desviación.

En el Gráfico 21 se representa, en escala semilogarítmica, las concentraciones experimentales detectadas en plasma y en leche, para cada oveja, tras la administración subcutánea de danofloxacino en solución del polímero P407 al 25%, a la dosis de 18 mg/kg y en el Gráfico 22 se representan sus respectivos valores promediados (media \pm SD). El análisis visual de estas curvas revela que los niveles en leche son superiores a los plasmáticos en todo momento.

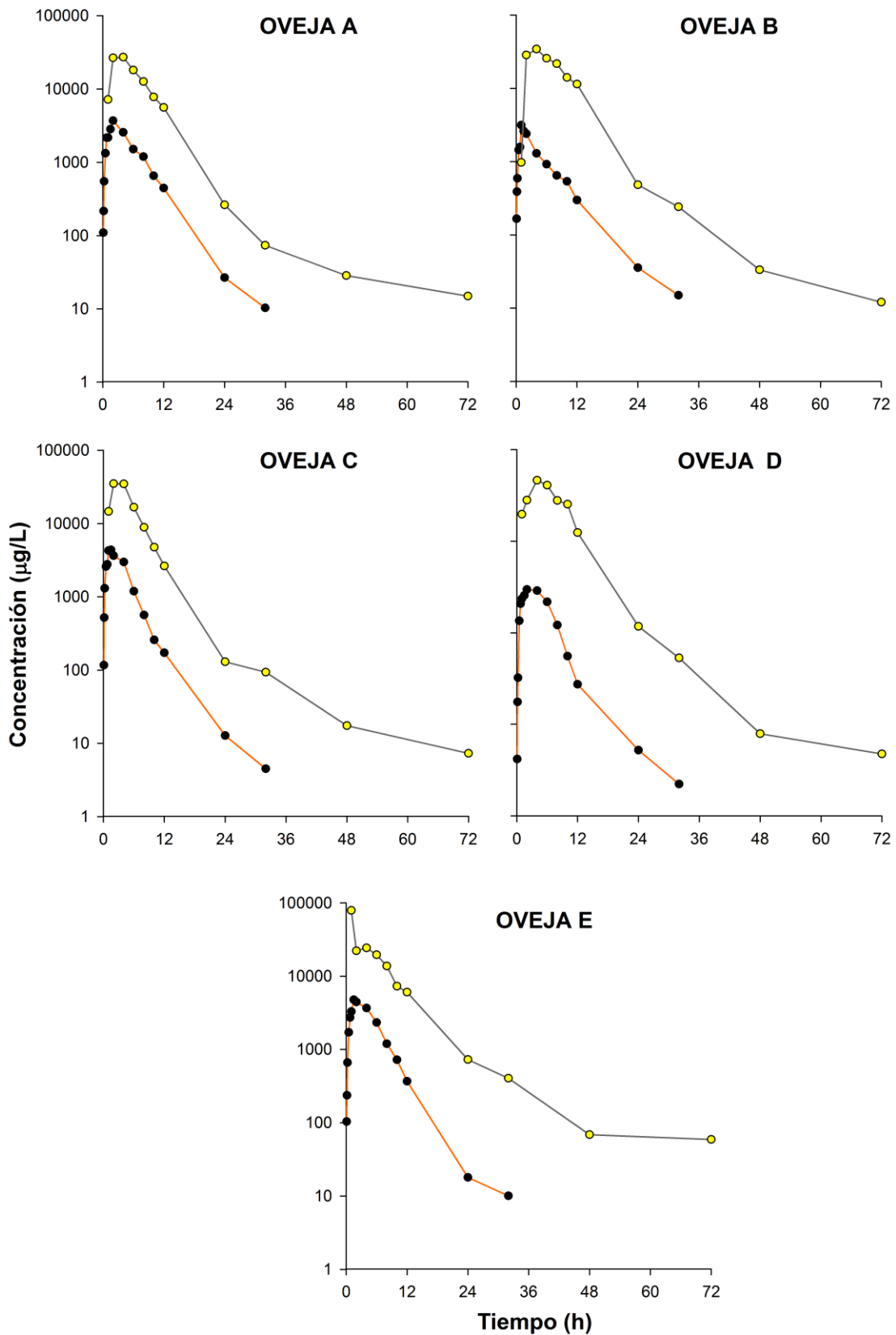


Gráfico 21.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de danofloxacin obtenidas en plasma (*línea naranja*), y en

leche (*línea gris*), tras la administración subcutánea de 18 mg/kg de danofloxacino en solución del polímero P407 al 25% a cada oveja.

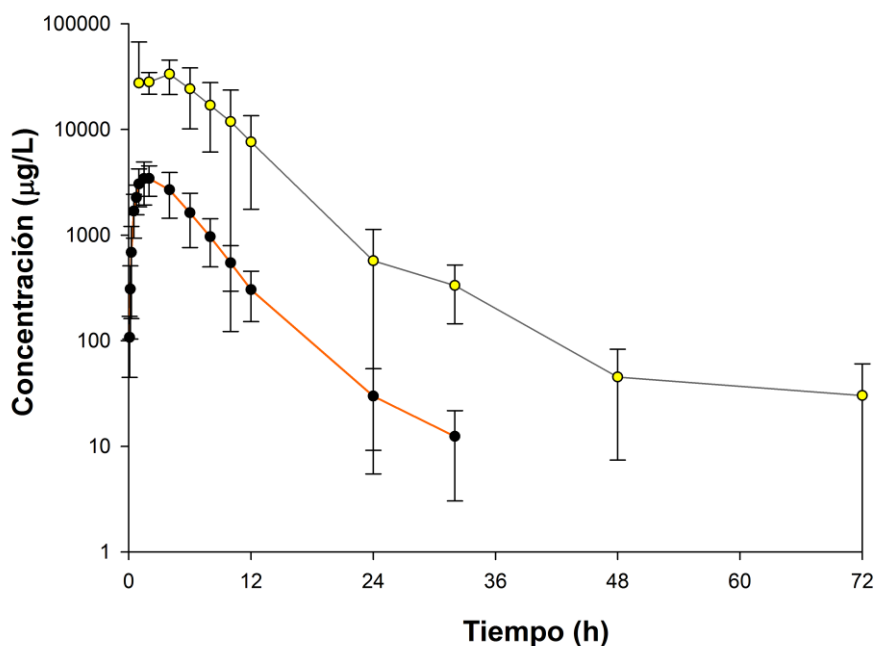


Gráfico 22.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de danofloxacino obtenidas en plasma (*línea naranja*), y en leche (*línea gris*), tras la administración subcutánea de una dosis de 18 mg/kg en solución del polímero P407 al 25%.

4.9.- EXCRECIÓN EN LECHE DE DANOFLOXACINO TRAS SU ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA CON SOLUCIÓN DEL POLÍMERO P407 AL 25% MÁS CARBOXIMETILCELULOSA AL 2%.

A continuación se muestran las concentraciones experimentales y sus estadísticos de desviación de danofloxacino, obtenidas en la leche de las ovejas, tras administrar una dosis subcutánea de 18 mg/kg de peso en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% (Tabla 36).

Tiempo (h)	Oveja A	Oveja B	Oveja C	Oveja D	Oveja E	MEDIA	SD	CV
1	5481,55	6349,21	5048,44	5625,94	8145,36	6130,10	1220,05	19,90
2	25467,25	17028,68	30076,19	10620,92	18645,36	20367,68	7572,57	37,18
4	37873,75	27039,05	24001,09	38547,76	19174,04	29327,14	8584,17	29,27
6	39309,43	21529,39	20602,53	35265,70	16929,13	26727,24	9896,33	37,03
8	24548,44	18584,21	14404,10	28811,37	16274,51	20524,53	6003,14	29,25
10	15095,56	13287,71	7963,88	20159,40	17002,69	14701,85	4545,16	30,92
12	8898,57	12353,12	3951,19	15500,69	12808,64	10702,44	4444,59	41,53
24	1746,97	965,47	519,98	752,55	836,39	964,27	466,69	48,40
32	66,90	272,52	251,40	258,40	264,15	222,67	87,42	39,26
48	29,39	42,12	43,88	53,03	99,27	53,54	26,92	50,28
72	8,52	-	-	15,36	23,15	15,68	7,32	46,69

TABLA 36.- Concentraciones experimentales y estadísticos de desviación de danofloxacino excretado en leche, expresadas en $\mu\text{g/L}$, en cada oveja tras la administración subcutánea de una dosis de 18 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2%.

Los gráficos 23 y 24 representan, en escala semilogarítmica, las concentraciones en leche para cada oveja, y el valor medios calculado (\pm S.D.) respectivamente.

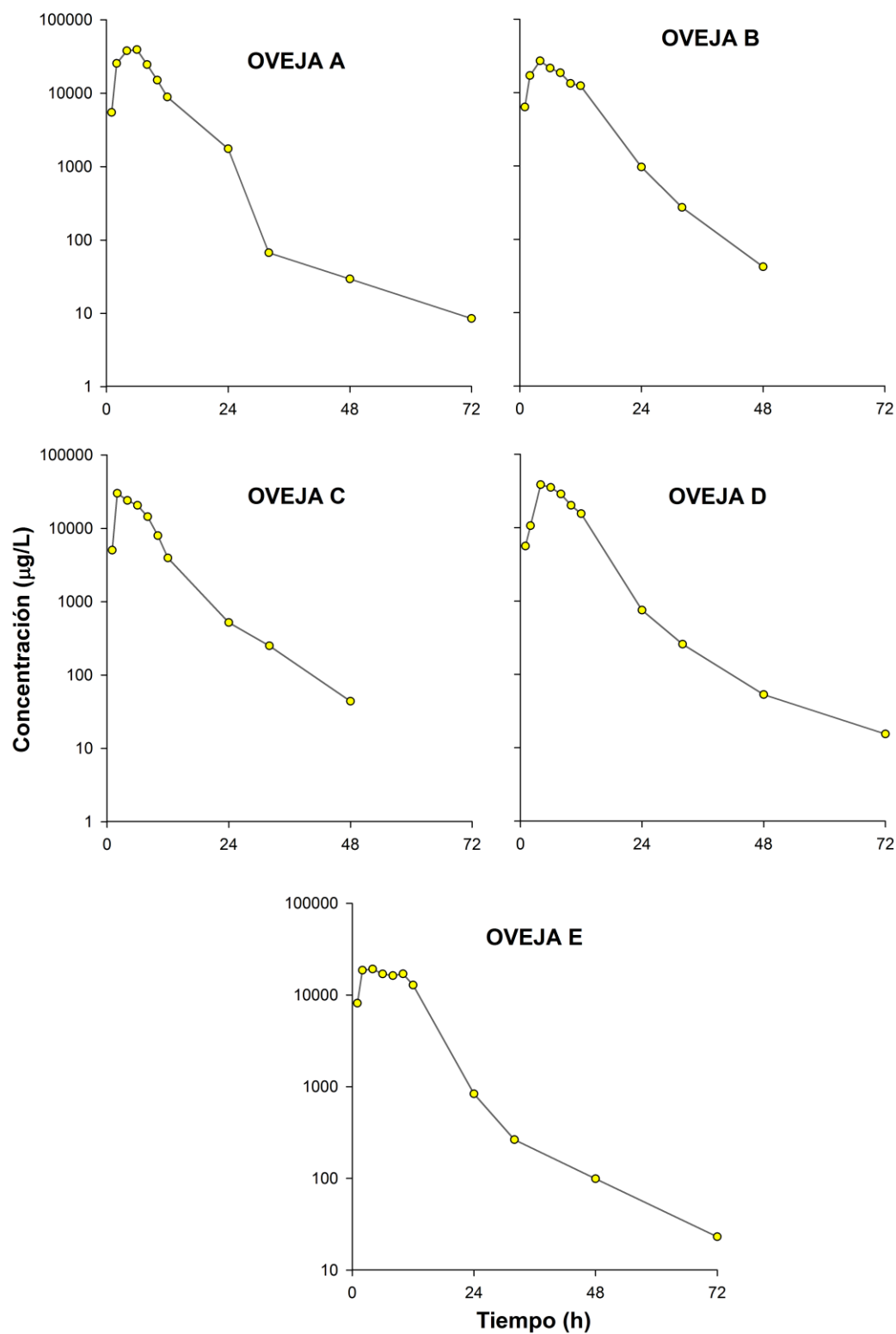


Gráfico.23 Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones detectadas en leche, para cada oveja, tras la administración subcutánea de 18 mg/kg de danofloxacino en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2%.

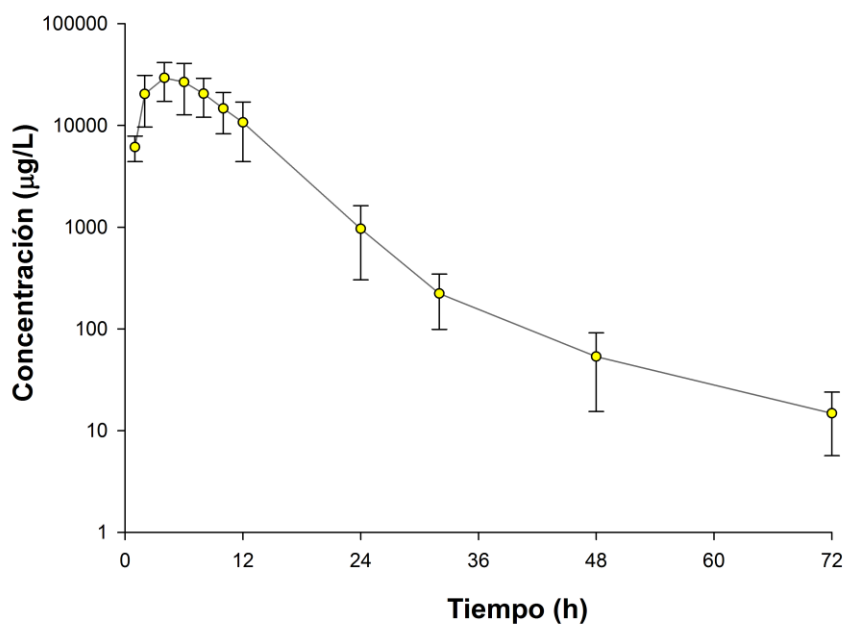


Gráfico 24.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de danofloxacino excretadas en leche tras la administración de una dosis de 18 mg/kg vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% (SC2) en ovejas.

La homogeneidad de los datos ha sido comprobada mediante la prueba de Levene (Tabla 37).

Pruebas de Homogeneidad de Varianzas para la Concentración		
Prueba de Levene para Concentración por Tiempo	Valor-P*	<0,001*
Prueba de Levene para Concentración por Animales	Valor-P*	0,093

TABLA 37.- Prueba de Levene para las concentraciones plasmáticas de danofloxacino excretadas en leche, tras la administración de una dosis subcutánea de de 6 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% a ovejas.

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

En la Tabla 38, se muestran las cantidades de danofloxacino en microgramos, excretadas en leche para cada animal en los diferentes tiempos de ordeño, tras la

administración subcutánea de 18 mg/kg de peso en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% junto con sus estadísticos de desviación.

Tiempo (h)	Oveja A	Oveja B	Oveja C	Oveja D	Oveja E	MEDIA	SD	CV
1	274,08	158,73	1539,77	281,30	325,81	515,94	575,66	111,58
2	1782,71	1021,72	4060,29	106,21	1491,63	1692,51	1468,09	86,74
4	3408,64	270,39	4200,19	963,69	1342,18	2037,02	1682,00	82,57
6	4717,13	2583,53	2266,28	387,92	3555,12	2702,00	1608,37	59,53
8	2209,36	1672,58	4681,33	1440,57	1464,71	2293,71	1370,11	59,73
10	2415,29	2126,03	1433,50	1007,97	1190,19	1634,60	608,60	37,23
12	222,46	617,66	355,61	775,03	320,22	458,20	229,64	50,12
24	1773,18	2099,90	571,98	1527,67	568,75	1308,29	703,56	53,78
32	13,38	193,49	119,42	104,65	84,53	103,09	64,87	62,93
48	16,02	22,74	49,14	64,70	89,34	48,39	30,20	62,42
72	4,64	1,55	3,73	18,74	20,83	9,90	9,13	92,18

TABLA 38.- Cantidad de danofloxacino excretada en leche, en μg , en cada tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% junto con sus valores promedio y sus estadísticos de desviación.

En la Tabla 39 se presentan los parámetros farmacocinéticos no compartimentales obtenidos en cada oveja, 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.

Parámetros	Oveja A	Oveja B	Oveja C	Oveja D	Oveja E	MEDIA	SD	CV
C_{max} ($\mu\text{g/L}$)	39309,43	27039,05	30076,19	38547,76	19174,04	30829,29	8400,38	27,25
T_{max} (h)	6,00	4,00	2,00	4,00	4,00	4,00	1,41	35,36
AUC ($\mu\text{g}\times\text{h/L}$)	341908,49	264880,23	211846,33	346933,30	248386,41	282790,95	59470,01	21,03
MRT (h)	7,89	8,70	6,98	8,57	9,32	8,29	0,89	10,76
AUC_{leche}/AUC_{plasma}	28,17	24,58	19,31	40,30	23,23	27,12	8,02	29,58
$C_{m\acute{a}x-leche}/C_{m\acute{a}x-plasma}$	21,14	14,33	15,58	25,16	14,32	18,11	4,85	26,77
% excreción	0,88	0,68	1,49	0,53	0,60	0,84	0,39	46,39

TABLA 39.- Parámetros farmacocinéticos no compartimentales de la leche, obtenidos tras la administración subcutánea de danofloxacino en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2%, a dosis de 18 mg/kg, a cada una de las ovejas junto con sus valores medios y sus estadísticos de desviación.

En el Gráfico 25 se representan, en escala semilogarítmica, las concentraciones experimentales detectadas en plasma y en leche, para cada oveja, tras la administración subcutánea de danofloxacino en solución del polímero P407 al 25%, a la dosis de 18 mg/kg.

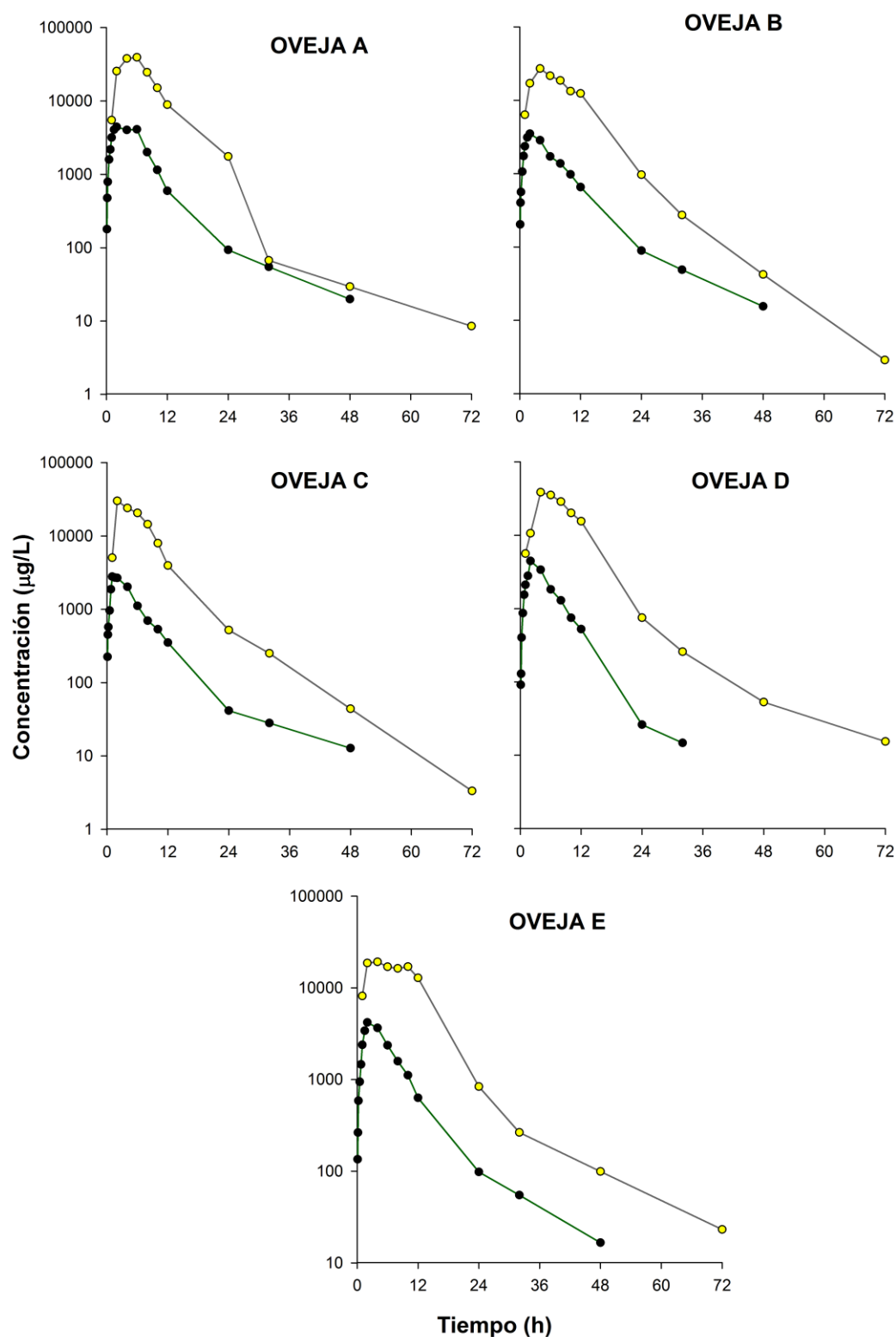


Gráfico 25.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de danofloxacino obtenidas en plasma (*línea verde*), y en leche (*línea gris*), tras la administración subcutánea de 18 mg/kg de danofloxacino en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% a ovejas.

En el Gráfico 26 se representan los valores medios (media \pm SD) de concentración detectados en plasma y en leche.

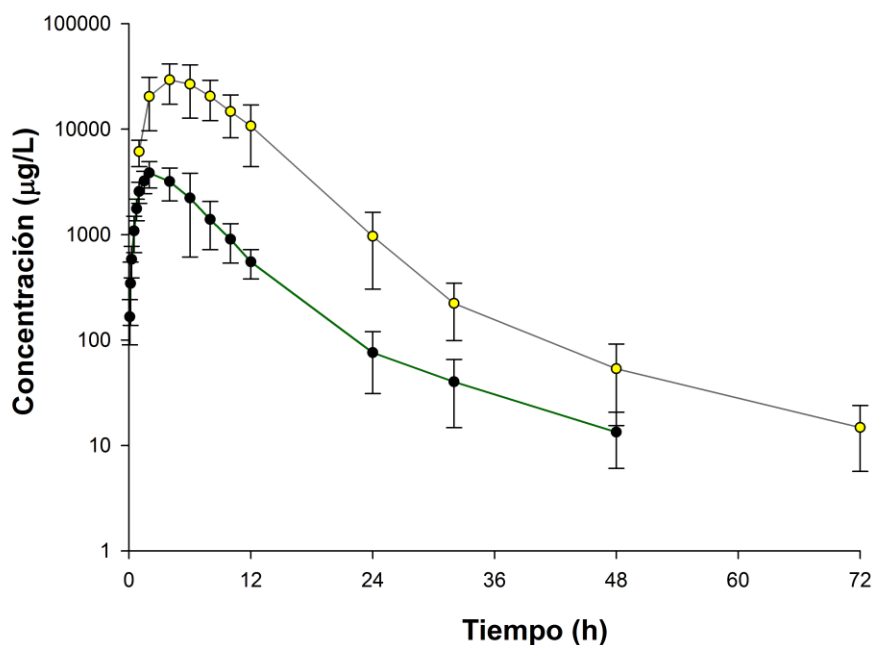


Gráfico 26.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de danofloxacino obtenidas en plasma (*línea verde*), y en leche (*línea gris*), tras la administración subcutánea de una dosis de 18 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% a ovejas.

Como podemos observar en el Gráfico 25 y 26, las concentraciones en leche de danofloxacino siguen la misma tendencia que en el resto de vías subcutáneas. La concentración de danofloxacino obtenida en plasma es muy inferior respecto de la detectada en leche a lo largo de todo el tiempo.

4.10.- COMPARATIVA DE LOS PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DE DANOFLOXACINO 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% MÁS CARBOXIMETILCELULOSA AL 2%.

A continuación se muestran los valores medios de los principales parámetros farmacocinéticos no compartimentales de danofloxacino, obtenidos en leche tras la administración de una dosis de 6 mg/kg por vía intravenosa (IV) y vía subcutánea (SC) y de 18 mg/kg por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y subcutánea en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% (SC2) (Tabla 40).

Parámetros	IV	SC	SC1	SC2
C_{max} ($\mu\text{g/L}$)	28734,58	20344,02	44370,58	30829,29
$T_{m\acute{a}x}$ (h)	2,00	3,20	3,00	4,00
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\times\text{h/L}$)	137643,92	141254,76	262664,38	282790,95
MRT (h)	4,10	6,85	7,49	8,29
$AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{plasma}}$	12,81	13,53	25,42	27,12
$C_{m\acute{a}x\text{-leche}}/C_{m\acute{a}x\text{-plasma}}$	4,73	12,04	17,38	18,11

TABLA 40.- Valor medio de los parámetros farmacocinéticos no compartimentales de danofloxacino obtenidos en leche, tras la administración de una dosis de 6 mg/kg por vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC), y 18 mg/kg por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a ovejas.

En el Gráfico 37 se representa, en escala semilogarítmica, los valores experimentales medios (\pm SD) de concentración en leche, obtenidos tras la administración de danofloxacino por las vías IV, SC, SC1 y SC2 y en el Gráfico 38 los valores medios (\pm SD) de las tres administraciones subcutáneas.

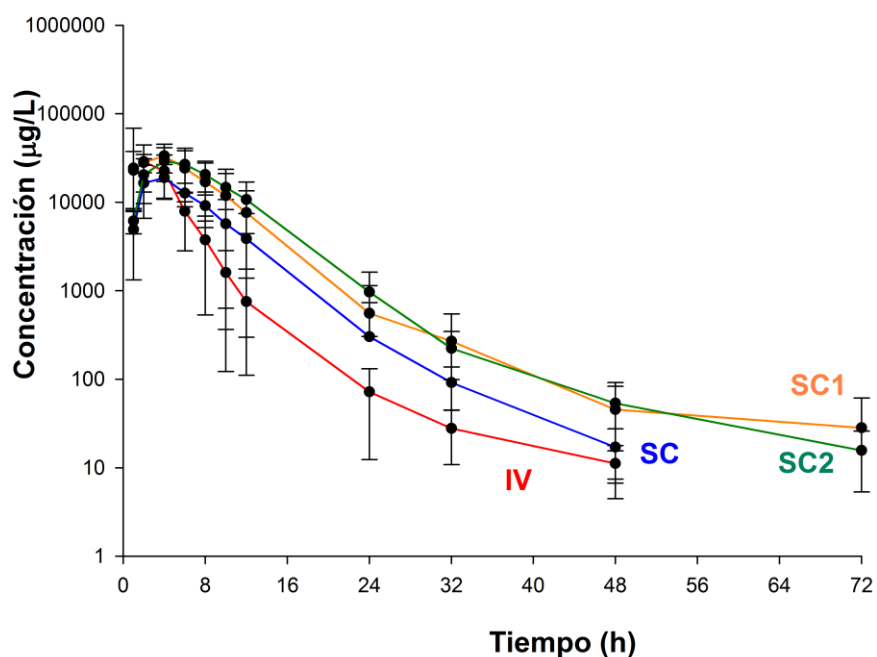


Gráfico 37.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de danofloxacino obtenidas en leche tras la administración de una dosis de 6 mg/kg por vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC), y de 18 mg/kg por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y subcutánea en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a ovejas.

Para verificar la existencia o no de diferencias significativas entre las administraciones de danofloxacino vía IV, SC, SC1 y SC2, se ha realizado un estudio estadístico no paramétrico (Kruskal-Wallis) entre los parámetros farmacocinéticos obtenidos mediante el análisis no compartimental. Los resultados de este estudio se muestran en la Tabla 41.

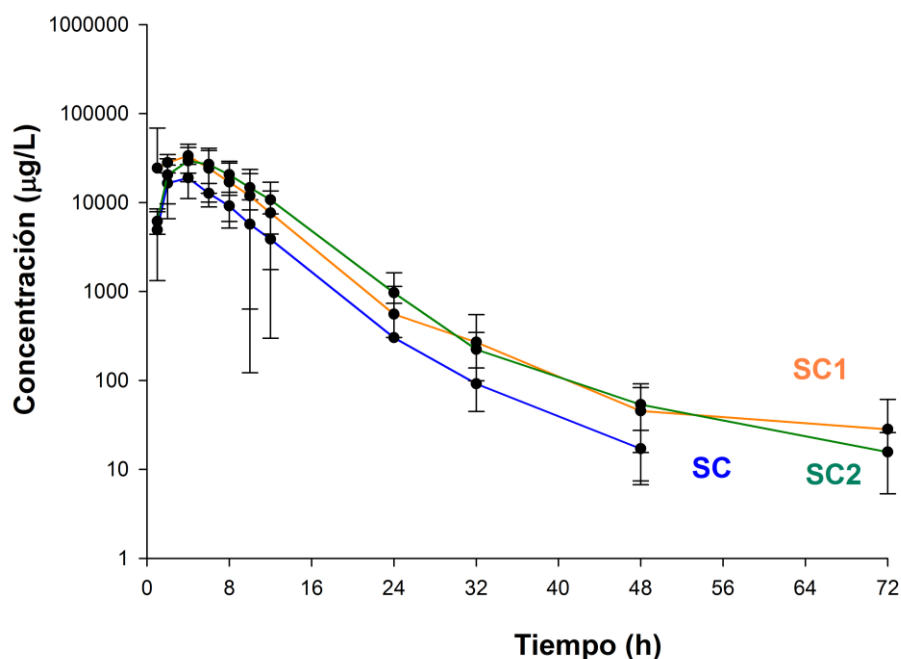


Gráfico 38.- Representación gráfica semilogarítmica de las concentraciones medias experimentales (\pm SD) de danofloxacino obtenidas en leche tras la administración de una dosis de 6 mg/kg por vía subcutánea (SC) y 18 mg/kg por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a ovejas.

Parámetros	Probabilidad (significación)	Parámetros	Probabilidad (significación)
$C_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{g/L}$)	0,036*	$AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{plasma}}$	0,002*
$T_{m\acute{a}x}$ (h)	0,109	$C_{m\acute{a}x\text{-leche}}/C_{m\acute{a}x\text{-plasma}}$	0,021*
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$)	0,002*	% excreción	0,009*
MRT (h)	0,006*		

TABLA 41.- Estudio comparativo no paramétrico (Kruskall-Wallis) entre los principales parámetros farmacocinéticos no compartimentales de danofloxacino en leche, obtenidos tras la administración de una dosis de 6 mg/kg por vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC), y 18 mg/kg por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y subcutánea en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a ovejas.

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

El test pone de manifiesto la existencia de diferencias significativas para todas las vías de administración (IV, SC, SC1 y SC2) y todos los animales en los parámetros farmacocinéticos $C_{m\acute{a}x}$, $AUC_{0-\infty}$, MRT y % de excreción, y ratios en leche (AUC_{leche}/AUC_{plasma} y $C_{m\acute{a}x-leche}/C_{m\acute{a}x-plasma}$).

Una vez realizada la prueba de Kruskal-Wallis, se realiza una segunda prueba no paramétrica en aquellos parámetros que muestran diferencias significativas, empleando la prueba U de Mann-Whitney para dos muestras independientes. Los resultados de esta prueba se muestran en la Tabla 42.

Parámetros	PSC/IV	PSC1/IV	PSC2/IV	PSC1/SC	PSC2/SC	PSC1/SC2
$C_{m\acute{a}x}(\mu\text{g/L})$	0,251	0,117	0,917	0,009*	0,028*	0,251
$AUC(\mu\text{g}\cdot\text{h/L})$	0,907	0,009*	0,009*	0,009*	0,009*	0,346
MRT (h)	0,009*	0,009*	0,009*	0,602	0,117	0,251
AUC_{leche}/AUC_{plasma}	0,754	0,009*	0,009*	0,009*	0,009*	0,465
$C_{m\acute{a}x-leche}/C_{m\acute{a}x-plasma}$	0,009*	0,019*	0,009*	0,004*	0,047*	0,081
% excreción	0,028*	0,754	0,076	0,009*	0,209	0,013*

TABLA 42.- Estudio comparativo no paramétrico (U de Mann-Whitney) entre los principales parámetros farmacocinéticos no compartimentales y ratios leche plasma obtenidos tras la administración de una dosis de 6 mg/kg de danofloxacino por vía intravenosa (IV) y vía subcutánea (SC) y 18 mg/kg por vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y subcutánea en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a ovejas.

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

Tras observar dicha tabla podemos concluir que:

- Para el valor de $C_{m\acute{a}x}$ entre las distintas vías no presenta diferencias significativas salvo en la relación entre la vía SC y SC1, y SC y SC2, donde

se aprecian diferencias significativas cuando se comparan dichas formulaciones.

- b) En el caso de AUC existen diferencias significativas en todas las comparaciones salvo cuando la relación se hace entre las vías IV/ SC, y entre SC1/ SC2.
- c) Cuando se trata del tiempo medio de residencia (MRT), sólo se observan diferencias significativas cuando se comparan formulaciones convencionales con poliméricas (SC, SC1 Y SC2). No se observan diferencias significativas cuando se comparan formulaciones poliméricas entre sí.
- d) En la comparativa de los ratios entre área bajo la curva en leche y plasma, se obtienen diferencias significativas en todos los casos, salvo cuando la relación se hace entre la vía IV y SC, y SC1 y SC2.
- e) La comparación de los ratios entre las concentraciones máximas en leche y plasma ($C_{\text{máx-leche}}/C_{\text{máx-plasma}}$), muestra diferencias significativas al entre todas las vías, excepto entre SC1 y SC2, donde no se aprecian diferencias.
- f) El porcentaje de excreción ha mostrado diferencias significativas en la mitad de las comparaciones, como ocurre entre IV/ SC, SC1/ SC, y SC1/ SC2.

4.11.- PARÁMETROS FARMACODINÁMICOS (CMI) OBTENIDOS FRENTE A CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*.

En la tabla contigua (Tabla 43) se detallan las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), en $\mu\text{g/mL}$, de danofloxacino obtenidas frente a 12 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de ovejas. Además se incluyen 2 cepas control: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922. En la tabla también se detalla la región en la que se aisló cada cepa y la fecha.

Los resultados obtenidos son $\text{CMI}_{90} = 0,125 \mu\text{g/mL}$ y un rango de 0,250 – 0,0625 $\mu\text{g/mL}$.

CEPA AISLADA	FECHA DE AISLAMIENTO	REGION	CONCENTRACIÓN DANOFLOXACINO
1	14/09/12	Valladolid	0,250
2	13/09/12	León	0,125
3	29/08/12	Teruel	0,125
4	25/07/12	León	0,125
5	20/07/12	Zamora	0,125
6	05/07/12	Valladolid	0,125
7	03/07/12	Toledo	0,125
8	21/06/12	Zamora	0,0625
9	20/06/12	Cádiz	0,125
10	12/06/12	Valladolid	0,0625
11	07/06/12	Salamanca	0,0625
12	07/06/12	Toledo	0,0625
<i>S.aureus</i> ATCC 29213			0,125
<i>E.coli</i> ATCC 25922			0,0312
MIC ₅₀ (mg/L) ^a			0,125
MIC ₉₀ (mg/L) ^a			0,125
Range (mg/L) ^b			0,250 - 0,0625

TABLA 43.- Valores de CIM's de danofloxacino frente a distintas cepas de *Staphylococcus aureus* en ovejas, así como la localización de la cepa y su fecha de aislamiento.

5.-DISCUSIÓN

5.1.- ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA DE DANOFLOXACINO EN OVEJAS

5.1.1.- MODELO FARMACOCINÉTICO

Tras ajustar las concentraciones plasmáticas de danofloxacino administrado por vía intravenosa, a una dosis de 6 mg/kg en ovejas, a los modelos farmacocinéticos mono- y bicompartimentales con y sin ponderación de los datos experimentales obtenidos para cada animal y, atendiendo al criterio de información de akaike o AIC (Yamaoka y cols., 1978), se concluye que el modelo bicompartimental con ponderación al inverso al cuadrado de las concentraciones plasmáticas es el más adecuado (Tabla 3).

En 1937, el premio Nobel Theodor Teorell, introduce el concepto del modelo bicompartimental abierto. Posteriormente es divulgado y desarrollado 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, sino más bien que se considera al organismo como dos compartimentos. Un compartimento 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).

El modelo bicompartimental coincide con las características farmacocinéticas de danofloxacino, es decir, presenta una buena distribución orgánica con una importante penetración a nivel intracelular (Brown, 1996).

En el estudio de Shem-Tov y cols (1997), tras administrar por vía intravenosa danofloxacino a ovejas, también se obtuvo un mejor ajuste del fármaco al modelo bicompartimental. Otros trabajos con danofloxacino administrado por la misma vía en distintas especies animales, también muestran un mejor ajuste al modelo bicompartimental: cabras (AliAbadi y Lees, 2001) y conejos (Fernández-Varón y cols., 2007).

El ajuste al modelo bicompartimental se ha obtenido en otros estudios tras la administración intravenosa de otras fluoroquinolonas y en otras especies animales como por ejemplo la cabras, es el caso de: 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 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 4). Para hallar la ecuación que mejor define la evolución de las concentraciones plasmáticas de danofloxacino en la oveja, 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 4.

Por consiguiente, la ecuación que define la evolución de las concentraciones plasmáticas, en la oveja tras la administración intravenosa, de una dosis única de 6 mg/kg de danofloxacino, adquiere el siguiente valor:

$$C = 4611,15 \cdot e^{-0,69 t} + 500,77 \cdot e^{-0,18 t} \quad \mu\text{g/L} \quad (2)$$

La representación semilogarítmica de las concentraciones individuales experimentales (Gráfico 1) y medias (Gráfico 2), pone de manifiesto que los niveles de danofloxacino descienden rápidamente en la fase inicial (primeros 45 minutos) y, a partir de este momento, disminuyen de forma más paulatina, dando lugar a una segunda fase que se mantiene hasta el final del proceso (hasta las 24 horas tras la administración).

Como corresponde a este modelo, la desaparición de danofloxacino del plasma de oveja, está regida por dos constantes híbridas de disposición. La primera de ellas, o constante de disposición rápida (λ_1), rige fundamentalmente los procesos de distribución y la segunda o constante de disposición lenta (λ_z), los procesos de eliminación. Una vez

alcanzado el equilibrio en la distribución, la constante de disposición rápida (λ_1), deja de tener influencia práctica, por lo que se puede asumir que la desaparición de danofloxacino del plasma, queda determinada por la constante de la última fase o constante de disposición lenta (λ_z). Por definición, el valor de λ_1 es siempre superior al de λ_z (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 velocidad más lenta en la segunda, detectándose concentraciones de danofloxacino en plasma hasta las 24 horas.

5.1.2.- PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS

A continuación se comentan los parámetros farmacocinéticos más representativos de danofloxacino tras su administración intravenosa a ovejas. En la Tabla 4 se muestran los parámetros farmacocinéticos compartimentales para cada uno de los animales, junto con sus valores medios y estadísticos asociados y en la Tabla 5 aparecen los parámetros farmacocinéticos no compartimentales del fármaco referentes a cada animal, junto con sus valores medios y estadísticos asociados.

5.1.2.1.- CONSTANTES HÍBRIDAS DE DISPOSICIÓN RÁPIDA Y LENTA

Las constantes λ_1 y λ_z se denominan constantes de disposición rápida y lenta que, farmacocinéticamente, son consideradas híbridas, al englobar los procesos de distribución y eliminación del fármaco (Doménech y cols., 1997). Estas constantes son de primer orden (Pla y del Pozo, 1974).

En el presente estudio, los valores medios de estas constantes para el danofloxacino han sido de 0,69 y 0,18 h⁻¹ para λ_1 y λ_z , respectivamente. En otro estudio con danofloxacino en ovejas llevado a cabo por Aliabadi F. y Landoni (2003a) reportó un valor similar para λ_z , 0,21 h⁻¹, pero sin embargo el valor obtenido para λ_1 fue 3,6 veces superior al nuestro (2,5 h⁻¹).

Otras flouroquinolonas estudiadas en ovejas, como es el caso de enrofloxacino, ha reportado valores más similares para λ_1 (0,55 h⁻¹) y λ_z (0,13 h⁻¹) (Bermingham y Papich, 2002).

Los estudios realizados por Aliabadi y Lee (2001) con danofloxacino administrado intravenosamente en otras especies animales como cabras, describen un valor superior para λ_1 ($1,46 \text{ h}^{-1}$) y prácticamente igual para λ_z ($0,16 \text{ h}^{-1}$).

Las constantes híbridas de disposición pueden relacionarse mediante la razón λ_1/λ_z , 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, la relación λ_1/λ_z puede calcularse, obteniéndose un valor de 3,83, el cual es indicativo de la diferencia existente entre ambas fases. Este valor indica que la distribución del danofloxacino es, preferentemente, bicompartimental y que es la constante λ_z la que controla principalmente los procesos anteriormente citados, ya que los regula durante más tiempo.

5.1.2.2.- MICROCONSTANTES

En el modelo bicompartimental, considerando que la eliminación del fármaco se produce desde el compartimento central, existen tres microconstantes de primer orden que rigen la distribución y eliminación del fármaco (Figura 1): 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}) (Doménech y cols., 1997).

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:

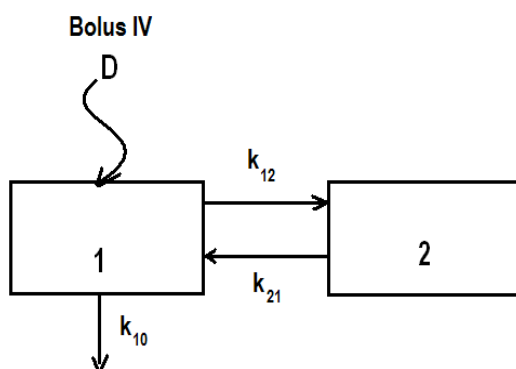


Figura 1.- Representación esquemática del modelo bicompartimental tras la administración intravenosa de un fármaco.

Los valores medios obtenidos para dichas constantes, en el caso de danofloxacino en ovejas, han sido: $k_{12} = 0,07 \text{ h}^{-1}$, $k_{21} = 0,25 \text{ h}^{-1}$ y $k_{10} = 0,50 \text{ h}^{-1}$ (Tabla 4). 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 el compartimento central. La distribución del fármaco al compartimento periférico también es considerable (k_{12}).

Si observamos estas constantes podemos establecer relaciones de interés, como la relación λ_z/k_{10} , que alcanza un valor de 0,36 y señala una eliminación global del antibacteriano desde todo el organismo, regida por una constante λ_z inferior a la verdadera constante de eliminación (k_{10}), lo que confirma de nuevo la adecuación de la disposición de danofloxacino a un modelo bicompartimental. Si esta relación adquiere un valor muy cercano o igual a 1, dado que el producto de las constantes híbridas es igual al producto de K_{21} y K_{10} , se cumpliría que K_{21} será igual a λ_1 . Ello, a su vez, indicaría que K_{12} sería cero. De tal forma que cuanto menor sea el valor de esta relación, mayor es la “bicompartimentalidad” del proceso.

Del estudio de la relación k_{12}/k_{10} , se obtiene un valor de 0,14. 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, superior a la de distribución del mismo. Que la velocidad de eliminación del fármaco sea superior a la de distribución, puede indicar que el compartimento periférico ocupa una menor parte del organismo, siendo el compartimento central el que ocupa la mayor parte del organismo.

Si estudiamos la relación entre la constante de transferencia y retorno, desde el compartimento periférico k_{12}/k_{21} , esta adquiere el valor de 0,28. Este resultado indica que el fármaco accede al compartimento periférico pero retorna al compartimento central, sin producirse retención del fármaco en el periférico.

Si estudiamos la relación k_{21}/k_{10} , se obtiene un valor de 0,50, por lo que el retorno del fármaco desde el compartimento periférico al compartimento central, no condiciona su eliminación. Esto concuerda con que no existe retención del fármaco en el compartimento periférico.

5.1.2.3.- TIEMPOS DE VIDA MEDIA Y TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA

El tiempo de vida media de la fase de disposición rápida ($t_{1/2\lambda 1}$) para danofloxacino, es de 1,14 horas, y el tiempo de vida media de la fase de disposición lenta ($t_{1/2\lambda z}$) 3,87 horas (Tabla 4), también considerado como tiempo de vida media o semivida del fármaco (Atkinson y Kushner, 1979; Gibaldi y Perrier, 1982).

El valor del tiempo de vida media de la fase de disposición rápida de nuestro estudio es idéntico al obtenido para el marbofloxacino (1,15 h; Fernández, 2013) y enrofloxacino en cabras (1,15 h, Titos, 2010).

De igual forma, el tiempo de vida media ($t_{1/2\lambda z}$) del presente trabajo, también es parecido al obtenido por Mckellar (3,35 h, 1998) y Aliabadi F. y Landoni (3,39 h, 2003a) y ligeramente superior al obtenido en el estudio de Escudero y cols., (3,07 h, 2007) utilizando la misma dosis.

Comparando con otras especies animales, nuestra $t_{1/2\lambda z}$, es superior al valor obtenido cuando se administró danofloxacino en bovino (2,9 h) a una dosis de 5 mg/kg (Mann y Frame, 1992). En terneros, a dosis de 1.25 mg/kg, se obtiene valores de 2,65 h, y en patos, a dosis de 5 mg/kg, 3,91 h (Goudah y Mouneir, 2009).

Respecto al valor de $t_{1/2\lambda z}$ de otras fluoroquinolonas en ovejas: para marbofloxacino, a dosis de 2 mg/kg, se han registrado valores tanto inferiores como superiores a los obtenidos en nuestro estudio (2,06 y 3,96 h; Shem-Tov y cols 1997, Sidhu y cols. 2010 Y, para enrofloxacino se han registrado valores de $t_{1/2\lambda z}$ del orden de 4,77, 3,88, 2,6 y 3,77 h (Bermingham y Papich, 2002; Pozzin y cols., 1997; Rahal y cols., 2006; Mengozzi y cols., 1996). En todos los casos se administró una dosis de 5 mg/kg de enrofloxacino, a excepción del último, en el que se utilizó una dosis de 2,5 mg/kg.

El análisis farmacocinético no compartimental permite calcular el tiempo medio de residencia (MRT). Este parámetro es independiente del modelo farmacocinético elegido y tiene un significado análogo al $t_{1/2\lambda z}$ que se halla en los modelos compartimentales. El MRT, se obtiene directamente de la curva experimental y puede

considerarse como una variable estadística aleatoria. El $t_{1/2z}$ por el contrario, es un parámetro obtenido a partir de la ecuación de ajuste.

En el presente estudio se ha obtenido un valor de MRT de 2,86 horas (Tabla 5), un resultado comparable al obtenido en ovejas por Escudero y cols. en 2007 (2,77 h) Rahal en 2006 (3,43 h) y Mckellar en 1998 (4,45 h).

Valores inferiores de MRT se han registrado en cabras (1,7 h, Atef., 2001; 2,47 h, Escudero y cols., 2007; 2,18 h, Mancevo, 2011) tras utilizar la misma dosis que en nuestro estudio y, cifras superiores se describen en conejos (4,14 h, Fernández- Varón, 2007), patos (4,18 h, Goudah y Mouneir, 2009) a dosis de 5 mg/kg, camellos (5,82 h, Aliabadi y cols., 2003b), monos (5,98 h, Kum C. y cols., 2008) y caballos (6,17 h, Fernández-Varón y cols., 2006a). Los valores más elevados de MRT se hallaron en tortugas (9,58 h, Marín y cols., 2008).

En cuanto a otras fluoroquinolonas estudiadas en ovejas, se han obtenido valores de MRT superiores para norfloxacin (13,04 h, González, 2001), difloxacin (8,07 h, Marín y cols., 2007d) y moxifloxacin (Cárceles y cols., 2009), e inferiores para ciprofloxacino (1,46 h, Muñoz P., 1996) a una dosis de 7,5 mg/kg.

5.1.2.4.- VOLÚMENES DE DISTRIBUCIÓN APARENTE

El volumen de distribución aparente de danofloxacin calculado en función del área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo (V_z) en ovejas, alcanza un valor de 3,29 L/kg, en tanto que el volumen de distribución en estado estacionario (V_{ss}) adquiere un valor de 1,66 L/kg (Tabla 5). Como se puede observar estos valores son altos, e indican que el fármaco tiene una excelente distribución en tejidos y fluidos en esta especie. La diferencia obtenida entre ambos volúmenes de distribución es consecuencia del método empleado para su cálculo. Estas diferencias condicionan la validez de un determinado volumen de distribución. En general, el volumen de distribución es útil para transformar concentraciones en cantidades de fármaco en el organismo y viceversa. Debido al método de cálculo, 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 ($V_{ss} = V_c + V_p$), en tanto que el V_z es válido en una zona más amplia de la curva de nivel plasmático, a partir de concentraciones anteriores

al inicio de la fase de disposición lenta hasta el final del proceso (Doménech y cols., 1997).

Los valores obtenidos en ovejas de V_z y V_{ss} por Escudero y cols., (2007), tras la administración de una dosis de 6 mg/kg, fueron 3,82 y 2,19 L/kg, respectivamente. Cifras comparables con las obtenidas en el estudio realizado por Aliabadi y cols., (2003a), a una dosis de 1,25 mg/kg, que registraron valores entorno a 3,37 y 2,76 L/kg, respectivamente. Idéntico valor de V_{ss} obtuvo Mckellar (2,76 L/kg, 1998) en ovejas tras la administración de danofloxacino en las mismas condiciones que Aliabadi.

Otros estudios realizados con danofloxacino en cabras describen valores entorno a 4,61 L/kg y 3,02 L/kg para V_z y V_{ss} , respectivamente (Aliabadi y Lees, 2001). Más parecidos a los nuestros en el caso de Mancebo (2011) con 3,01 y 1,61 L/kg, respectivamente, o 3,37 y 0,85 L/kg en el estudio de Fernández (2013), administrando una dosis de 6 y 2 mg/kg respectivamente. En pollos, a dosis de 5 mg/kg se ha obtenido un valor V_z de 13,7 L/kg (Knoll y cols., 1999) y en tortugas, a dosis de 6 mg/kg, 2,41 L/kg (Marín y cols., 2008).

Para otras fluoroquinolonas en ovejas se han registrado valores de V_z de 1,1 L/kg para el enrofloxacino (Bermingham y Pupich, 2002) y de 2,59 L/kg (Sidhu y cols 2010) para marbofloxacino.

En relación al volumen de distribución en el estado estacionario (V_{ss}), se han señalado valores similares a los presentados en nuestro estudio tanto en ovejas como en diferentes especies animales. Nuestro dato es muy parecido al obtenido en ovejas (1,9 L/kg; Shem-Tov y cols., 1997) y ganado bovino (2,04 L/kg, Shem-Tov y cols., 1998) a dosis de 1,25 mg/kg; y también similar al valor registrado para caballos (2 L/Kg, Fernández-Varón y cols., 2006a). Se han obtenido cifras superiores en pavos (6,59 L/kg, Haritova y cols., 2006) y conejos (3,16 L/kg y Fernández-Varón y cols., 2007), e inferiores en tortugas (1,02 L/kg, Marín y cols., 2008). Los mayores valores de V_{ss} corresponden al grupo de las aves, desde un valor mínimo de 5,41 L/kg hasta el máximo de 10,2 L/kg, en patos (Goudah y Mouneir., 2009), pavos (Haritova y cols., 2006) y pollos, (Knoll y cols., 1999). Todos estos valores demuestran que las quinolonas se distribuyen ampliamente en tejidos.

Respecto a otras fluoroquinolonas en ovejas; enrofloxacino ha mostrado cifras de Vss inferiores a 1L/kg (0,97 L/kg, Bermingham y Pupich, 2002); ciprofloxacino, a una dosis de 7,5 mg/kg, entorno a 1,89 L/kg (Muñoz, 1996) y norfloxacino a una dosis de 10 mg/kg, 1,05 L/kg (González, 1997).

5.1.2.5.- ÁREA BAJO LA CURVA

El valor de AUC obtenido para danofloxacino en ovejas es de 10465,13 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ (Tabla 5). Este valor es 1,3 veces superior al obtenido por Escudero y cols. (2007), bajo las mismas condiciones de administración, de 7580 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$. Otros estudios en ovejas, con danofloxacino a una dosis de 1,25 mg/kg, han mostrado valores de AUC entorno a 5 veces menores: 2060 (Mckellar, 1998) y 1810 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$, (Aliabadi y cols., 2003a).

En cabras (Escudero y cols., 2007) y cerdos (Mann y Frame, 1992) los valores de AUC para danofloxacino, también son inferiores al nuestro, concretamente 6080 y 7900 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$, a una dosis de 6 y 5 mg/kg respectivamente y en caballos (3800 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$; Fernández-Varón y cols., 2006a) y camellos (2860 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$; Aliabadi y cols., 2003b), a dosis de 1,25 mg/kg, se obtienen valores de AUC aún más bajos. En aves, en patos (5530 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$; Goudah y Mounier, 2009) y pollos (3550 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$; Knoll y cols., 1999) a dosis de 5 mg/kg, se obtienen valores muy inferiores, pero también se han observado valores ligeramente superiores en pavos (10770 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$; Haritova y cols., 2006). En tortugas, a las mismas dosis que en nuestro estudio, se han obtenido un AUC 5 veces superior (56540 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$; Marín y cols., 2008) al de la oveja.

En la oveja, otras fluoroquinolonas, como el enrofloxacino, a dosis de 2,5 mg/kg, presenta un valor de AUC inferior al de nuestro estudio, concretamente de 1200 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ (Mengozzi y cols., 1996). Marbofloxacino en las mismas condiciones de dosis y vía que las nuestras, presenta un valor superior, 9990 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ (Sidhu y cols 2010) y norfloxacino, a una dosis de 10 mg/kg, 47971 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ (González, 1997). Con ciprofloxacino, a una dosis de 7,5 mg/kg se ha obtenido un AUC de 7022,33 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ (Muñoz, 1996).

5.1.2.6.- 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 CI en función del área bajo la curva mediante análisis no compartimental. El valor obtenido ha sido de 0,58 L/kg·h (Tabla 5).

Otros estudios realizados en ovejas con danofloxacino han obtenido valores similares: 0,79 L/kg·h a dosis de 6 mg/kg (Escudero y cols., 2007) y 0,71, 0,67 y 0,63 L/kg·h a dosis de 1,25 mg/kg (Aliabadi y cols., 2003a, Shem-Tov y cols., 1997 y McKellar y cols., 1998).

Valores similares a los descritos en nuestro estudio han sido encontrados en otros animales. En cabras, bajo las mismas condiciones, 0,79 L/kg·h y 0,75 L/kg·h (Escudero y cols., 2007 y Mancebo, 2011); 0,71 en búfalos (Sappal y cols., 2009) y 0,59 L/kg·h en pavos (Haritova y cols., 2006).

Cifras superiores de aclaramiento plasmático de danofloxacino se han obtenido en pollos (1,41 L/kg·h, Knoll y cols., 1999) y patos (Goudah y Mouneir, 2009), a dosis de 5 mg/kg. Valores inferiores se describen en tortugas (0,11 L/kg·h, Marín y cols., 2008), terneros (0,55 y 0,48 L/kg·h, Friis, 1993), a dosis de 1,25 mg/kg, caballos (0,34 L/kg·h, Fernández-Varón y cols., 2006b) y camellos (0,44 L/kg·h, Aliabadi y cols., 2003b), a dosis de 6 mg/kg de peso.

Estudios con otras fluoroquinolonas en ovejas señalan valores inferiores, 0,48 L/kg·h para marbofloxacino (Sidhu y cols., 2010) y 0,20 L/kg·h para enrofloxacino (Bermingham y cols., 2002) y superiores para ciprofloxacino, a una dosis de 7,5 mg/kg (1,08 L/kg·h; Muñoz, 1996).

5.2.- ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA DE DANOFLOXACINO EN OVEJAS

5.2.1.- MODELO FARMACOCINÉTICO

La evolución de las concentraciones plasmáticas de danofloxacino, tras la administración subcutánea de 6 mg/kg en ovejas (tabla 6), se ha ajustado, igual que en la administración intravenosa, a modelos compartimentales con y sin ponderación de los datos experimentales.

En todos los animales estudiados el valor de AIC (Tabla 8) indica un mejor ajuste a un modelo bicompartimental con ponderación al inverso al cuadrado de la concentración. Así, la evolución de las concentraciones plasmáticas de danofloxacino, tras su administración subcutánea, sigue un modelo farmacocinético bicompartimental abierto con absorción de primer orden y con tiempo de latencia. La ecuación que describe la evolución de las concentraciones plasmáticas de danofloxacino, tras su administración subcutánea, obtenida con los parámetros medios, adopta el siguiente valor:

$$C = 33673,39 \cdot e^{-0,46 t} + 527,38 \cdot e^{-0,14 t} - 34200,77 \cdot e^{-1,36 t} \quad \text{g/L (4)}$$

En la literatura no se registran estudios compartimentales en ovejas tras la administración subcutánea de danofloxacino. El único estudio encontrado realiza un análisis no compartimental de las concentraciones plasmáticas (Escudero y cols., 2007).

Igual que en la administración intravenosa, y tras un análisis de la homogeneidad de la varianza (Tabla 7), se ha verificado la homogeneidad de los datos obteniéndose que, la única fuente de variación es el tiempo, por lo que se manifiesta homogeneidad en las concentraciones a un tiempo determinado para todos los animales.

El modelo bicompartimental hallado en nuestro estudio se ha obtenido también con otras flouoroquinolonas tras su administración subcutánea. Es el caso de marbofloxacino en conejos y cabras (Álamo, 2012 y Fernández 2013) o enrofloxacino en cabras (Titos, 2010). Sin embargo, existen estudios con danofloxacino en cabras que han registrado un mejor ajuste al modelo monocompartimental (Mancebo, 2011).

También se han recogido estudios en ovejas, concretamente con enrofloxacino administrado subcutáneamente, que han dado mejor ajuste a un modelo monocompartimental, (Rahal y cols., 2006).

5.2.2.- PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS

Los parámetros farmacocinéticos obtenidos por análisis compartimental y no compartimental para danofloxacino, se muestran en las Tablas 9 y 10 respectivamente, y van referidos a cada animal, junto con los valores medios y estadísticos asociados.

Pasamos a continuación a comentar los parámetros farmacocinéticos más representativos del fármaco tras su administración subcutánea a ovejas.

5.2.2.1.- TIEMPOS DE VIDA MEDIA, MRT Y MAT

Al igual que en la vía intravenosa, se ha calculado el tiempo de vida media de la fase de disposición rápida ($t_{1/2\lambda_1}$) para danofloxacino y el tiempo de vida media de la fase de disposición lenta ($t_{1/2\lambda_2}$), considerado como tiempo de vida media o semivida del fármaco (Atkinson y Kushner, 1979; Gibaldi y Perrier, 1982). Estos valores son de 1,55 y 5,18 h, respectivamente (Tabla 9).

Estos valores resultan ser similares a los obtenidos tras la administración intravenosa (1,14 h y 3,87 h, Tabla 4), para $t_{1/2\lambda_1}$ y $t_{1/2\lambda_2}$, respectivamente. Esto indica que la permanencia del fármaco tras la administración por vía subcutánea es 1,3 veces superior a la de la vía intravenosa.

Estudios de danofloxacino en ovejas bajo las mismas condiciones de vía y dosis, han registrado valores de semivida de eliminación entorno a 3,07 h (Escudero y cols., 2007). El mismo estudio en cabras, reportó un valor de 4,09 h. Danofloxacino administrado subcutáneamente en otras especies animales, presenta semividas que van desde 1,53 h en vacas (Mestorino y cols., 2009), a 8,20 h en conejos (Fernández-Varón, 2007) y 18,71 h en tortuga boba, administrado a dosis de 6 mg/kg (Marín y cols., 2008).

En ovejas, otras fluoroquinolonas como el enrofloxacino, presentan valores superiores de semivida, concretamente 7,12 h (Rahal y cols., 2006).

El MRT presenta un valor de 5,23 h (Tabla 10). Éste parámetro es 1,8 veces mayor que el descrito tras la administración intravenosa (Tabla 5).

En ovejas se han encontrado valores de MRT similares a los hallados en nuestro estudio, concretamente de 4,93 h (Escudero y cols., 2007) a la misma dosis de administración. Valores aproximados se obtuvieron también en cabras (4,51 h; Escudero y cols., 2007), en conejos (4,72 h; Fernández-Varón, 2007) y en terneros (4,69 h; Mckellar y cols., 1999), si bien la dosis en éstos últimos fue de 1.25 mg/kg de peso.

Otros estudios realizados con danofloxacino en diferentes animales han reportado valores de MRT superiores, en el caso de tortuga boba y ganado vacuno: 9,33

y 18,38 h, respectivamente (Marín y cols., 2008; Mestorino y cols., 2009) tras administrar una dosis de 6 mg/kg.

En la Tabla 10, se presentan los valores correspondientes al MRT y el tiempo medio de absorción (MAT) subcutáneos; en tanto que el MRT intravenoso aparece en la Tabla 5. A la vista de los resultados obtenidos para cada uno de estos parámetros en los distintos animales, se puede apreciar como en todas las ovejas, excepto en la oveja E, el valor de MAT es inferior al del MRT intravenoso. Si se consideran los valores medios obtenidos, el MRT intravenoso (2,86 h) resulta ser entorno a 1,2 veces superior al MAT subcutáneo (2,38 h). De ello se concluye que, en principio, la absorción, tras la administración subcutánea de danofloxacino, no condiciona su eliminación.

Bajo las mismas condiciones de estudio con danofloxacino en ovejas y cabras, se han registrado valores de MAT de 2,07 y 2,01 h, respectivamente (Marín y cols., 2008). Mancebo (2011) también obtuvo un valor similar (2,21 h) en cabras. En ovejas los datos son escasos. Se han señalado valores muy inferiores a los nuestros en tortuga boba y conejos, de 0,75 h y 0,59 h (Marín y cols., 2008; Fernández-Varón y cols., 2007). En todos los estudios realizados, los valores de MAT han sido inferiores a los del MRT intravenoso.

Estudios con otras fluoroquinolonas, como el difloxacino en ovejas, han descrito cifras de MAT similares a los encontrados en nuestro estudio (3,67 h, Marín y cols., 2007d). Enrofloxacino o marbofloxacino en cabras a una dosis de 5 y 2 mg/kg respectivamente, 2,30 y 1,00 h (Titos, 2010, Fernández, 2013).

5.2.2.2.- TIEMPO MÁXIMO Y CONCENTRACIÓN MÁXIMA

Tras la administración extravasal, se debe tener en cuenta otros parámetros como es el tiempo en que se alcanza la concentración plasmática máxima o tiempo máximo ($T_{m\acute{a}x}$). Dicho parámetro es independiente de la dosis, pero sí se modifica en función de la forma farmacéutica y la vía de administración, puesto que depende de la constante de absorción. En el presente estudio, el valor de este parámetro ha sido de 2,19 h (Tabla 9).

En el estudio realizado por Escudero y cols. (2007) en ovejas y cabras, se han hallado cifras de $T_{m\acute{a}x}$ inferiores a los reportados en nuestro estudio (1,63 h). En cambio, es parecido en vacas (2,17 h) (Mestorino y cols., 2009).

En otras especies animales se han reportado valores de $T_{m\acute{a}x}$ inferiores: 1,46 h en tortuga boba (Marín y cols., 2008), 0,68 h en conejos (Fernández-Varón y cols., 2007), 1 y 1,25 h en ganado bovino a dosis de 5 y 1.25 mg/kg de peso respectivamente (Mann y Frame, 1992; McKellar y cols., 1999). Estos datos nos indican que, en la oveja, se produce una absorción más rápida del danofloxacino que en estos otros animales.

En la oveja, el enrofloxacino presenta un $T_{m\acute{a}x}$ muy parecido (2 h, Rahal y cols., 2006), en tanto que el difloxacino tiene un valor de $T_{m\acute{a}x}$ muy superior (5,33 h, Marín y cols., 2007d).

En cuanto a la concentración plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$), el valor obtenido para danofloxacino en ovejas, ha sido de 1709,57 $\mu\text{g/L}$ (Tabla 9). Escudero y cols. (2007), tras la administración de la misma dosis, obtuvieron una $C_{m\acute{a}x}$ comparable de 1480 $\mu\text{g/L}$ en ovejas y 1,6 veces inferior, 1050 $\mu\text{g/L}$, en cabras.

En otras especies animales, danofloxacino presenta valores de $C_{m\acute{a}x}$ superiores (1790 y 10350 $\mu\text{g/L}$ en conejos y tortuga boba, respectivamente (Fernández-Varón y cols., 2007; Marín y cols., 2008)), pero también inferiores (630 $\mu\text{g/L}$ y 530 $\mu\text{g/L}$ en ganado vacuno y vacas lecheras respectivamente (Mann y Frame, 1992; Mestorino y cols., 2009)).

El estudio de otras flouroquinolonas en ovejas ha reportado distintas cifras para $C_{m\acute{a}x}$, por ejemplo: entorno a 660 $\mu\text{g/L}$ para el enrofloxacino a dosis de 5 mg/kg (Rahal y cols., 2006) o 1390 $\mu\text{g/L}$ para el difloxacino a dosis de 6 mg/kg (Marín y cols., 2007d).

5.2.2.3.- CONSTANTE DE ABSORCIÓN Y SEMIVIDA DE ABSORCIÓN

La ecuación 4 define la evolución de las concentraciones plasmáticas, tras la administración subcutánea de danofloxacino en ovejas. 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 1,36 h^{-1} (Tabla 9) y la vida media asociada a la misma ($t_{1/2ka}$) 0,52 h.

Si comparamos el valor obtenido para $t_{1/2ka}$ con el obtenido para $t_{1/2\lambda z}$ intravenoso, que es 3,87 h (Tabla 4), podemos observar como este último es casi 7 veces superior, lo

que indica que la fase de absorción no condicionaría la eliminación del danofloxacino en la oveja.

En el estudio de Mancebo (2011), tras administrar danofloxacino a cabras bajo las mismas condiciones de dosis y vía de administración, se obtuvo un valor de k_a y $t_{1/2ka}$ de $0,55 \text{ h}^{-1}$ y $1,33 \text{ h}$ respectivamente. Cifras a la inversa que las nuestras, con un valor de k_a 2,5 veces inferior al nuestro y 2,5 veces superior para $t_{1/2ka}$.

Otros valores de k_a de danofloxacino tras su administración subcutánea, solo se disponen en conejos y vacas, de $4,11$ y $1,46 \text{ h}^{-1}$ respectivamente, y les corresponden unos valores de $t_{1/2ka}$ de $0,17$ y $0,64 \text{ h}$, respectivamente (Fernández-Varón y cols., 2007; Mestorino y cols., 2009). Como podemos observar, nuestro valor se encuentra entre uno y otro, por lo que la absorción del danofloxacino, tras su administración subcutánea en ovejas, es mucho más lenta que en conejos pero más rápida que en vacas.

Cifras casi iguales a las nuestras se obtuvieron en el estudio que se llevó a cabo en ovejas tratadas con enrofloxacino subcutáneo, a dosis de 5 mg/kg , obteniendo valores de k_a y $t_{1/2ka}$ de $1,48 \text{ h}^{-1}$ y $0,58 \text{ h}$, respectivamente (Rahal y cols., 2006).

En la bibliografía se describen más valores de k_a y $t_{1/2ka}$ para otras fluoroquinolonas administradas subcutáneamente en cabra. Por ejemplo $1,34 \text{ h}^{-1}$ y $2,19 \text{ h}$ respectivamente, para difloxacino a una dosis de 5 mg/kg (Marín y cols., 2007c), $0,46 \text{ h}^{-1}$ y $0,52 \text{ h}$ para enrofloxacino a 5 mg/kg (Titos, 2010), o $2,08 \text{ h}^{-1}$ y $0,33 \text{ h}$ para marbofloxacino a 2 mg/kg (Fernández, 2013).

5.2.2.4.- ÁREA BAJO LA CURVA Y BIODISPONIBILIDAD

El AUC, obtenido tras la administración subcutánea, alcanza un valor de $10636,59 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ (Tabla 10). Esta cifra es ligeramente superior a la obtenida en el estudio de Escudero y cols. (2007), en el que, a igualdad de dosis, se obtiene un valor de $7110 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ para la oveja y $5840 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ para cabra.

Otro estudio de danofloxacino en cabras, bajo las mismas condiciones que el nuestro, reportó un valor de AUC de $8040 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ (Mancebo, 2011). En vacas, a dosis de 6 y 5 mg/kg , 4300 y $9690 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ respectivamente (Mann y Frame, 1992; Mestorino y cols., 2009).

Otra fluoroquinolona, como el enrofloxacin, al ser estudiada en ovejas, y en igualdad de condiciones que en nuestro estudio, reportó una cifra de AUC aproximadamente 1,2 veces inferior a la nuestra (8780 µg·h/L; Rahal y cols., 2006).

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

$$F = \frac{AUC_{sc} \cdot D_{iv}}{AUC_{iv} \cdot D_{sc}} \cdot 100 \quad (5)$$

La biodisponibilidad obtenida es elevada, del orden del 104,16% (Tabla 10), lo que indica que, posiblemente, todo el fármaco acceda a la circulación sistémica. Escudero y cols. (2007) también obtuvieron una elevada biodisponibilidad en ovejas (93,6%) y en cabras (97 %), al igual que Mancebo (2011) en su estudio de danofloxacin en cabras, que obtuvo una biodisponibilidad de 99,55%.

En el estudio realizado por Mann y Frame (1992) en vacas, se obtienen datos inferiores de biodisponibilidad, concretamente del 72%, si bien la dosis administrada fue menor, de 5 mg/kg. También son cifras inferiores las obtenidas en ovejas tras administrar enrofloxacin subcutáneamente (50,62%, Rahal y cols., 2006).

Del estudio de otras fluoroquinolonas en cabras, se conocen más datos de biodisponibilidad tras su administración subcutánea: 71% enrofloxacin (Titos, 2010), 90,16% difloxacin (Marín y cols., 2007c) y hasta un 108,96% el orbifloxacin (Marín y cols., 2007a). Si bien la dosis administrada fue de 5 mg/kg, excepto el orbifloxacin que se administró a dosis de 2.5mg/kg.

5.3.- ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA DE DANOFLOXACINO EN SOLUCIÓN DEL POLÍMERO P407 AL 25% EN OVEJAS

5.3.1.- MODELO FARMACOCINÉTICO

La evolución de las concentraciones plasmáticas de danofloxacin, tras la administración subcutánea de 18 mg/kg en solución del polímero P407 al 25% (en adelante formulación SC1) a ovejas, se ha ajustado a modelos mono y

bicompartmentales, tanto con ponderación como sin ponderación de los datos experimentales.

Según los valores de AIC obtenidos (Tabla 13), el modelo farmacocinético que mejor describe la evolución de las concentraciones de danofloxacino tras su administración subcutánea en la formulación SC1, es el modelo bicompartmental abierto con absorción de primer orden y tiempo de latencia, al igual que ocurría tras la administración subcutánea sin polímero.

En la literatura no existen estudios farmacocinéticos en ovejas realizados con danofloxacino en fórmulas de liberación controlada como es el caso de la formulación SC1. Sin embargo, el estudio de Mancebo (2011) se realizó bajo las mismas condiciones que el nuestro, pero en cabras. De dicho trabajo se obtuvo, al igual que en el nuestro, un mejor ajuste para el modelo bicompartmental abierto con absorción de primer orden. De la misma manera, enrofloxacino y marbofloxacino en cabras a 5 y 6 mg/kg respectivamente para formulaciones del tipo SC1, presentaron la misma tendencia de modelo bicompartmental (Titos, 2010; Fernández, 2013).

5.3.2.- PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS

Los parámetros farmacocinéticos obtenidos por análisis compartimental y no compartimental, de danofloxacino en formulación SC1, se muestran en las Tablas 14 y 15. Todos los parámetros van referidos a cada animal y a sus valores medios y estadísticos asociados.

5.3.2.1.- TIEMPOS DE VIDA MEDIA, MRT Y MAT

El tiempo de vida media de la fase de disposición rápida ($t_{1/2\lambda 1}$) para danofloxacino ha sido 1,97 h y el tiempo de vida media de la fase de disposición lenta ($t_{1/2\lambda 2}$), considerado como tiempo de vida media o semivida del fármaco (Atkinson y Kushner, 1979; Gibaldi y Perrier, 1982), 10,27 h (Tabla 14).

El $t_{1/2\lambda 1}$ obtenido resulta ser casi 1,8 veces superior al obtenido tras la administración intravenosa (Tabla 4), que es de 1,14 h.

En cuanto al $t_{1/2\lambda 2}$ (10,27 h), resulta ser casi 2,8 veces superior al obtenido tras la administración intravenosa (3,87 h; Tabla 4), y 2 veces superior al obtenido tras la

administración subcutánea sin polímero (5,18 h; Tabla 9). Esto es indicativo de que la formulación con polímero aumenta la permanencia del danofloxacino en el organismo.

Si comparamos la semivida del fármaco obtenida en nuestro estudio al administrar el danofloxacino en formulación SC1, con el valor obtenido en otro estudio en ovejas cuando se administró vía subcutánea sin polímero a la misma dosis de 6 mg/kg (Escudero y cols., 2007), la diferencia es mayor a la obtenida en el nuestro, unas 3,3 veces. Una relación semejante, resulta cuando la comparamos con la semivida de danofloxacino, tras su administración subcutánea sin polímero, en otros animales tales como la cabra (Escudero y cols., 2007). También en este caso, la relación obtenida es de 2,5 veces mayor.

Como era de esperar, se ha producido un aumento de la vida media del danofloxacino administrado con la formulación SC1 respecto a la vía intravenosa y SC sin polímero. Este mismo caso se reproduce al administrar danofloxacino a cabras a razón de 6 mg/kg (Mancebo, 2011), en las que se obtienen las siguientes semividas: 1,77 h (IV) -- 1,5 h (SC) -- 8,26 h (SC1). También en el estudio de otras fluoroquinolonas se ha observado esta tendencia, así para difloxacino en cabras (Marín y cols., 2010c), las semividas obtenidas son de 5,23 h (IV) -- 5,69 h (SC) -- 32,36 h (SC1). Para enrofloxacino en cabras (Titos, 2010) la misma secuencia obtuvo valores de: 10,44 h (IV) -- 12,42 h (SC) -- 19,97 h (SC1). Por lo tanto, el alargamiento de la vida media en el caso de danofloxacino es similar o ligeramente inferior al esperado, teniendo en cuenta los resultados obtenidos con la misma formulación para las fluoroquinolonas anteriores.

Por otro lado, el MRT alcanza un valor de 5,45 h (Tabla 15). Este parámetro es casi dos veces mayor al descrito tras la administración intravenosa (2,86 h; Tabla 5). Igualmente, es un poco superior al obtenido vía subcutánea sin polímero (5,23 h; Tabla 10).

En la Tabla 15, se presentan los valores correspondientes a los MRT y el tiempo medio de absorción (MAT) subcutáneos cuando se administró danofloxacino en formulación SC1; en tanto que el MRT intravenoso aparece en la Tabla 5. A la vista de los resultados obtenidos para cada uno de estos parámetros en los distintos animales, se puede apreciar como en dos (oveja B y D) de los cinco animales presentan un valor de MAT superior al MRT intravenoso. Si se consideran los valores medios obtenidos,

resulta que el MRT intravenoso (2,86 h) resulta entorno a 1,1 veces superior al MAT subcutáneo tras la administración del danofloxacino en formulación SC1 (2,59 h). De ello puede concluirse que, en principio, la permanencia de danofloxacino en el punto de administración es, en comparación, ligeramente inferior a la permanencia de dicho fármaco en el organismo de la oveja, tras su absorción.

5.3.2.2.- TIEMPO MÁXIMO Y CONCENTRACIÓN MÁXIMA

El $T_{m\acute{a}x}$ ha resultado ser 2,56 h (Tabla 14). Si lo comparamos con el $T_{m\acute{a}x}$ obtenido en la vía subcutánea sin polímero (2,19 h; Tabla 9), resulta ser casi igual.

Un valor inferior, concretamente de 1,42 h, se obtuvo en cabras cuando se administró danofloxacino con la misma formulación SC1 (Mancebo, 2011). Sin embargo, el valor de $T_{m\acute{a}x}$, resultó ser superior para la administración de enrofloxacino, también en cabras, por vía subcutánea en solución SC1 (4,03 h, Titos Arcos, 2010). En el caso de difloxacino en cabras (Marín y cols., 2010) el valor obtenido fue de 3,6 h.

Los valores de $T_{m\acute{a}x}$ para el danofloxacino administrado por vía subcutánea sin polímero en ovejas fueron inferiores (1,6 h; Escudero y cols., 2007) y en terneros aun más (0,23 h; Mckellar y cols., 1999).

La $C_{m\acute{a}x}$, obtenida para danofloxacino en formulación SC1 en ovejas, ha sido de 2537,42 $\mu\text{g/L}$ (Tabla 14), 1,5 veces superior a la $C_{m\acute{a}x}$ alcanzada tras la administración subcutánea sin polímero (1709,57 $\mu\text{g/L}$; Tabla 9). Teniendo en cuenta que la administración de danofloxacino junto con polímero se hizo a una dosis tres veces superior (18 mg/kg, en lugar de 6 mg/kg), el valor obtenido resulta ser inferior al obtenido tras la administración subcutánea.

Para danofloxacino administrado en cabras con la misma formulación, el $C_{m\acute{a}x}$ fue de 4340 $\mu\text{g/L}$ (Mancebo, 2011). Sin embargo, los valores obtenidos en el estudio de otras fluoroquinolonas fueron más parecidos al nuestro. Es el caso de enrofloxacino y difloxacino en cabras, con cifras de 2930 y 2970 $\mu\text{g/L}$ respectivamente (Titos, 2010; Marín y cols., 2010).

En nuestro trabajo, la concentración inicial alcanzada por vía intravenosa a una dosis de 6 mg/kg, es aproximadamente 2,5 veces superior a las concentraciones máximas experimentales alcanzadas cuando se administró una dosis de 18 mg/kg junto con polímero vía subcutánea.

5.3.2.3.- CONSTANTE DE ABSORCIÓN Y SEMIVIDA DE ABSORCIÓN

Tras la administración de danofloxacino en formulación SC1 a ovejas, se ha obtenido un valor aparente de la constante de absorción (k_a) de $0,45 \text{ h}^{-1}$ (Tabla 14) y de la vida media asociada a la misma ($t_{1/2ka}$) de 1,58 h (Tabla 14). Si los comparamos con los valores de k_a y de $t_{1/2ka}$ obtenidos tras la administración subcutánea sin polímero; $1,36 \text{ h}^{-1}$ y 0,52 h (Tabla 9), podemos observar como la absorción es 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.

Al comparar el valor de $t_{1/2ka}$ con el $t_{1/2\lambda z}$ intravenoso (3.87 h, Tabla 4), se observa que éste último es casi 2,5 veces superior, lo que concuerda con lo observado entre el MRTiv y el MAT; la permanencia del danofloxacino en el lugar de administración es menor que su permanencia en el organismo de la oveja tras su absorción, sólo que esto es más evidente con los valores de estos parámetros. Por tanto, la absorción con esta formulación con polímero no ocasiona un fenómeno de flip-flop.

En el estudio de Mancebo (2011) con danofloxacino en cabras y bajo las mismas condiciones de dosis y formulación SC1, se obtuvieron unos valores de k_a y $t_{1/2ka}$ muy similares a los nuestros, del orden de $0,55 \text{ h}^{-1}$ y 1,34 h respectivamente. Enrofloxacino en cabras también reportó valores de k_a y $t_{1/2ka}$ similares ($0,31 \text{ h}^{-1}$ y de 2,29 h, Titos, 2010).

5.3.2.4.- ÁREA BAJO LA CURVA Y BIODISPONIBILIDAD

El valor de AUC, obtenido tras la administración subcutánea de una dosis de 18 mg/kg de danofloxacino en formulación SC1, fue de $21628,83 \mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ (Tabla 15). Muy similar al obtenido para danofloxacino, en cabras de $21540 \mu\text{g}\cdot\text{h/L}$, a la dosis de 18 mg/kg con la formulación SC1 (Mancebo, 2011). Sin embargo, para enrofloxacino y difloxacino, administrados en formulación SC1 a una dosis de 15 mg/kg cada uno (Titos, 2010, Marin y cols., 2010), 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.

Si comparamos dicho valor de AUC, con el obtenido en la vía subcutánea sin polímero e intravenosa, el AUC es 2 veces mayor en ambos casos, teniendo en cuenta que se ha administrado una dosis tres veces superior en la formulación SC1.

La biodisponibilidad obtenida ha sido del 69,52% (Tabla15). Como podemos observar, la asociación del polímero hace que la biodisponibilidad sea inferior, ya que el valor de biodisponibilidad obtenido cuando se administró el danofloxacino vía subcutánea con polímero fue del 104,16% (Tabla10), reduciéndose aproximadamente en un 30% si se compara con la vía subcutánea e intravenosa.

Esta disminución en la biodisponibilidad también se detecta en los estudios anteriormente mencionados: un 10% para danofloxacino en cabras si se compara con la vía subcutánea, y 11% si se compara con la vía intravenosa. (Mancebo, 2011) y un 15% para enrofloxacino, también en cabras, si se compara con la vía subcutánea, y 45% si se compara con la vía intravenosa (Titos, 2010).

5.4.- ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA DE DANOFLOXACINO EN SOLUCIÓN DEL POLÍMERO P407 AL 25% MÁS CARBOXIMETILCELULOSA AL 2% EN OVEJAS

5.4.1.- MODELO FARMACOCINÉTICO

Teniendo en cuenta los valores más favorables de AIC (menor valor), se ha comprobado que la evolución de las concentraciones plasmáticas en todos los animales así como para las concentraciones medias, se ajustan a un modelo bicompartimental con ponderación a la inversa de sus cuadrados y con tiempo de latencia; al igual que ha ocurrido en las vías y formulaciones anteriores (Tabla 18). Por tanto, podemos afirmar que el modelo farmacocinético bicompartimental abierto es el que mejor describe la evolución de las concentraciones plasmáticas experimentales obtenidas tras la administración subcutánea de una dosis de 18 mg/kg de danofloxacino en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% (en adelante formulación SC2) en ovejas.

Como en ocasiones anteriores, y tras un análisis de la varianza no paramétrico (Tabla 17), 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.

Tras la búsqueda bibliográfica pertinente, no se han encontrado estudios farmacocinéticos con danofloxacino en fórmulas de liberación controlada como es el caso de la formulación SC2 en ovejas, pero el resultado obtenido concuerda con lo que hemos encontrado con la formulación SC1. Además, y siguiendo la comparativa con el estudio de Mancebo (2011), en su análisis compartimental y no compartimental de danofloxacino con la formulación SC2 en cabras, obtiene un mejor ajuste al mismo modelo bicompartimental y con ponderación. Lo mismo sucede en el estudio con enrofloxacino de Titos (2010).

5.4.2.- PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS

A continuación se van a comentar los parámetros farmacocinéticos más representativos del danofloxacino en la formulación SC2 tras su administración subcutánea a ovejas. Las concentraciones experimentales obtenidas y los parámetros farmacocinéticos resultantes tras el análisis compartimental para cada uno de los animales, se exponen las Tablas 19 y 20 respectivamente. En las Tablas 21 se recogen los parámetros farmacocinéticos no compartimentales del fármaco referentes a cada animal.

5.4.2.1.- TIEMPOS DE VIDA MEDIA, MRT Y MAT

Siguiendo el mismo orden que en las formulaciones anteriores, se ha calculado el tiempo de vida media de la fase de disposición rápida ($t_{1/2\lambda,1}$) para danofloxacino en las cinco ovejas ajustadas a un modelo bicompartimental obteniendo un valor de 2,07 h, y el tiempo de vida media de la fase de disposición lenta ($t_{1/2\lambda,z}$) con un valor de 13,49 h, considerado como tiempo de vida media o semivida del fármaco (Atkinson y Kushner, 1979; Gibaldi y Perrier, 1982), al igual que en la vía intravenosa y subcutáneas anteriores.

El $t_{1/2\lambda,1}$ (2,07 h) resulta ser casi 2 veces superior al obtenido tras la administración intravenosa (1,14 h; Tabla 4). Si lo comparamos con las administraciones subcutáneas con y sin el polímero P407 (1,55 h y 1,97 h), podemos observar que el valor de $t_{1/2\lambda,1}$ es 1,3 veces superior frente a la administración SC y casi igual a la SC1. Por tanto, esta formulación SC2 de danofloxacino no ralentiza el $t_{1/2\lambda,1}$ respecto a cuando se administra con la formulación SC1, pero si cuando se administra sin polímero.

En cuanto al $t_{1/2\lambda_z}$, el valor obtenido (13,49 h; Tabla 20) resulta ser 3,7 veces superior al obtenido tras la administración intravenosa (3,87 h, Tabla 4). Igualmente, si la comparamos con las vías subcutáneas sin y con el polímero P407 (5,18 y 10,27 h respectivamente), el resultado es 2,6 y 1,3 veces superior. Esto puede ser indicativo de que el proceso de absorción puede ser un factor limitante de la eliminación.

Si comparamos la semivida obtenida al administrar danofloxacino en formulación SC2, con los valores obtenidos en el caso de danofloxacino en cabras con la formulación SC2, el aumento de la vida media respecto a la vía intravenosa y SC sin y con polímero fue 2,97 h (IV) -- 1,5 h (SC) -- 8,26 h (SC1) -- 7,47 h (SC2) (Mancebo 2011). Para otras fluoroquinolonas administradas con la misma formulación SC2 en cabras, el aumento de la vida media fue, respecto a la vía intravenosa y SC sin y con polímero de: en el caso de difloxacino de 5,23 h (IV) -- 5,69 h (SC) -- 32,36 h (SC1) -- 35,19 h (SC2) (Marín y cols 2010), en el caso de enrofloxacino de 10,44 h (IV) -- 12,42 h (SC) -- 19,97 h (SC1) -- 48,30 h (SC2) (Titos, 2010), y para moxifloxacino 7,52 h (IV) -- 9,72 h (SC) -- 14,26 h (SC1) -- 16,25 h (SC2) (Fernández, 2013).

Por lo tanto, el alargamiento de la vida media con el mismo fármaco es superior en ovejas frente a cabras, y si se compara con otras fluoroquinolonas, el alargamiento es menor, teniendo en cuenta los resultados obtenidos con la misma formulación (sobre todo para enrofloxacino).

El MRT alcanza, en este caso, un valor de 7,13 h (Tabla 20). Este parámetro al compararlo con el valor descrito en la vía intravenosa es 2,5 veces mayor (2,86 h; Tabla 5). También es superior, en 1,3 veces, al obtenido vía subcutánea sin polímero (5,23 h; Tabla 10) y en 1,3 veces cuando se administra vía subcutánea con formulación SC1 (5,45 h; Tabla 15).

Si comparamos el valor obtenido de MRT cuando se administra el danofloxacino vía subcutánea en formulación SC2, con el obtenido al administrarlo solo, podemos ver que es mayor ya que los valores de MRT reportados están entorno a 4,93 h (Escudero y cols., 2007). De la misma manera, el MRT obtenido por Mancebo (2011) en su estudio con danofloxacino en cabras y la misma formulación SC2, adquiere un valor también menor, 5,44 h.

En las Tabla 20, se presentan los valores correspondientes a los MRT y el tiempo medio de absorción (MAT) subcutáneos cuando se administró danofloxacino en formulación SC2; en tanto que el MRT intravenoso aparece en las Tabla 5. 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 superior al MRT intravenoso. Si se consideran los valores medios obtenidos, el MRT intravenoso (2,86 h) resulta ser inferior al MAT subcutáneo tras la administración de marbofloxacino en formulación SC2 (4,28 h). De ello se concluye que, en principio, la permanencia del fármaco en el lugar de administración es mayor que la persistencia del mismo una vez absorbido, por lo que la absorción puede ser un factor limitante en todos los demás procesos farmacocinéticos con esta formulación. Este hecho no se produce con la formulación SC1, donde el valor del MAT es ligeramente inferior al del MRTiv.

5.4.2.2.- TIEMPO MÁXIMO Y CONCENTRACIÓN MÁXIMA

El valor de $T_{m\acute{a}x}$ obtenido para danofloxacino administrado en formulación SC2 es 2,84 h (Tabla 19), similar al descrito cuando administramos por vía subcutánea el danofloxacino con la formulación SC1 (2,56 h; Tabla 14). Sin embargo, si lo comparamos con el $T_{m\acute{a}x}$ hallado cuando administramos el danofloxacino vía subcutánea sin el polímero P407, la diferencia es considerable, siendo el valor de este último 1,3 veces inferior (2,19 h; Tabla 9). Es decir, el administrar el danofloxacino en formulación SC1 o SC2 retrasa el $T_{m\acute{a}x}$ de danofloxacino en plasma de ovejas.

Un valor similar se encontró en el estudio de Mancebo (2011), 2,33 h, y se obtuvieron cifras superiores en el estudio de enrofloxacino y moxifloxacino por vía subcutánea en solución SC2 en cabras, resultando un valor de $T_{m\acute{a}x}$ de 4,33 h y 4,00 h respectivamente (Titos; 2010, Fernández; 2013).

La $C_{m\acute{a}x}$, obtenida para danofloxacino en formulación SC2 en ovejas, ha sido de 3087,89 $\mu\text{g/L}$ (Tabla 19): 1,2 veces superior a la obtenida cuando se administró por vía subcutánea en formulación SC1 (2537,42 $\mu\text{g/L}$; Tabla 14) y 1,8 veces superior a la $C_{m\acute{a}x}$ alcanzada tras la administración subcutánea sin polímero (1709,57 $\mu\text{g/L}$; Tabla 9). Ahora bien, si comparamos el valor reportado con la concentración inicial alcanzada por vía intravenosa al administrar una dosis de 6 mg/kg de danofloxacino, vemos que este último alcanza un valor 1,5 veces superior a la $C_{m\acute{a}x}$ aquí obtenida. Hay que tener en

cuenta que la administración del fármaco con las formulaciones controladas SC1 y SC2 se hizo a una dosis de 18 mg/kg, 3 veces superior a cuando se administró sin polímero.

Otros valores de $C_{m\acute{a}x}$ recogidos en la bibliografía: 2830 $\mu\text{g/L}$ en cabras tras administrar danofloxacino en formulación SC2 (Mancebo 2011), 2065,75 $\mu\text{g/L}$ en cabras tras administrar marbofloxacino en cabras (Fernández; 2013) y 2037,22 $\mu\text{g/L}$ en cabras también tras administrar enrofloxacino en idéntica formulación (Titos; 2010). Como se puede observar, el valor de $C_{m\acute{a}x}$ obtenido es superior a los comparados.

5.4.2.3.- CONSTANTE DE ABSORCIÓN Y SEMIVIDA DE ABSORCIÓN

Tras la administración de danofloxacino en formulación SC2 a ovejas, se ha obtenido una constante de absorción aparente (k_a) de $0,39\text{ h}^{-1}$ y una vida media asociada a la misma ($t_{1/2k_a}$) de 1,81 h (Tabla 19).

Al comparar esta k_a y $t_{1/2k_a}$ con las obtenidas tras la administración subcutánea de danofloxacino en formulación SC1 ($0,45\text{ h}^{-1}$ y 1,58 h; Tabla 11) podemos observar que la absorción es 0,86 veces más lenta. También existen diferencias al compararla con la k_a y $t_{1/2k_a}$ cuando se administra el fármaco vía subcutánea sin el polímero P407 ($1,36\text{ h}^{-1}$ y 0,52 h; Tabla 9), resultando en el caso que nos ocupa, una absorción aproximadamente 3,5 veces más lenta. Ello se debe a que esta formulación retarda la liberación del fármaco. Se da la circunstancia de que la k_a es menor (casi 1.3 veces) a la constante de eliminación k_{10} (0.50 h^{-1}), cosa que ocurre cuando se presenta un modelo flip-flop.

Para la misma formulación SC2 en cabras con danofloxacino (Mancebo; 2011) se obtuvieron valores para k_a de $0,42\text{ h}^{-1}$ y $t_{1/2k_a}$ de 1,68 h, mientras que por vía subcutánea con y sin polímero fueron de k_a : 0,33 y $0,31\text{ h}^{-1}$ respectivamente, y para $t_{1/2k_a}$: 2,21 y 2,28 h respectivamente. De esta manera podemos observar que la absorción es más lenta para la formulación SC2 respecto a la SC1 y subcutánea sin polímero (similares entre ellas).

5.4.2.4.- ÁREA BAJO LA CURVA Y BIODISPONIBILIDAD

El AUC, obtenido tras la administración subcutánea de una dosis de 18 mg/kg de danofloxacino en formulación SC2, alcanza un valor de 27728,93 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ (Tabla 20), ligeramente superior al obtenido con la formulación SC1 (21628,83 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$, Tabla 15) y casi 2,5 veces superior al obtenido por vía subcutánea sin polímero (10636,59 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$, Tabla 9) a una dosis tres veces inferior.

Respecto al AUC obtenido en el estudio de Mancebo (2011) con danofloxacino en la formulación SC2, alcanza un valor de 17540 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$, significativamente inferior al nuestro y al obtenido por Titos (2010), en el estudio de enrofloxacino en cabras con la misma formulación a dosis de 15 mg/kg (34339,40 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$)

La biodisponibilidad obtenida ha sido 89,33% (Tabla 20). Si comparamos el valor de biodisponibilidad descrito tras la administración del danofloxacino vía subcutánea en formulación SC2, con el obtenido tras la administración del danofloxacino vía subcutánea SC1 (69,52%; Tabla 15), podemos destacar un aumento de la misma en casi un 20%.

Ahora bien, si comparamos el valor de biodisponibilidad descrito tras la administración del danofloxacino vía subcutánea en formulación SC2 (89,33%) con el obtenido tras la administración del danofloxacino vía subcutánea sin polímero (104,16%; Tabla 10), podemos destacar una reducción del 15%.

La biodisponibilidad de danofloxacino se ha descrito en cabras tras su administración en idénticas condiciones en el estudio de Mancebo (2011) y reportó un valor del 73,04%.

5.5.- COMPARACIÓN ENTRE ADMINISTRACIONES

La disposición plasmática de danofloxacino 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% más 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 controlada, lo cual influye en las fases de disposición, haciendo que las curvas de las formulaciones SC1 y SC2 se desplacen hacia la derecha, respecto a la curva de la administración SC. Pero para poder

cuantificar esta afirmación es necesario comparar los parámetros farmacocinéticos obtenidos en cada caso, entre ellos, $t_{1/2\lambda z}$, $t_{1/2k_a}$, λ_z , k_a , C_{max} , T_{max} , MRT, MAT, 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 22. Una vez realizada dicha prueba, se realiza una segunda prueba en aquellos parámetros que muestren diferencias significativas, la U de Mann-Whitney para muestras pareadas o también llamada suma de rangos de Wilcoxon cuyos resultados se muestran en la Tabla 23.

5.5.1.- TIEMPO DE VIDA MEDIA ($T_{1/2\lambda z}$)

Puede observarse en los valores presentados en la Tabla 22 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 prueba U de Mann-Whitney (Tabla 23), que indica que los valores de $t_{1/2\lambda z}$ son similares entre formulaciones poliméricas cuando se comparan entre sí, tal y como cabría esperar, pero diferentes al comparar la formulación convencional con ellas.

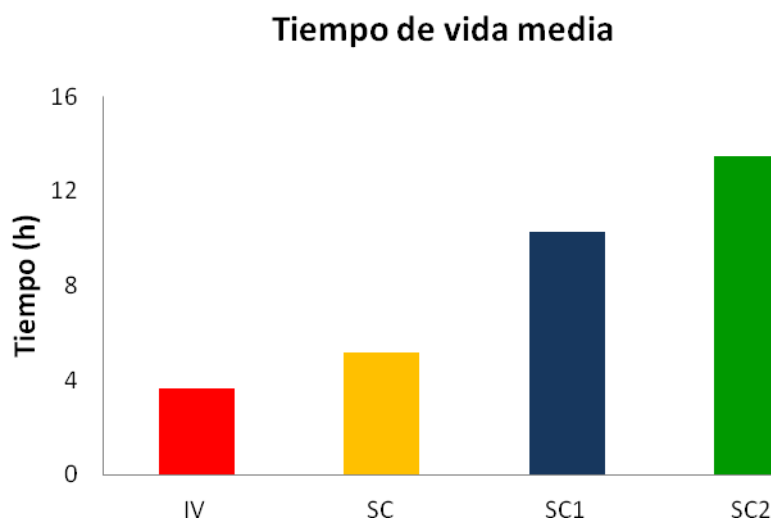


Figura 3.- Tiempos de vida media ($t_{1/2\lambda z}$) obtenidos en la oveja tras la administración de danofloxacino vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC) a una dosis de 6 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y vía subcutánea en solución

del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 18 mg/kg.

Este hecho corrobora nuestra hipótesis de partida, en cuanto a conseguir un alargamiento en las vidas medias que permita unos intervalos de dosificación más amplios con las formulaciones controladas.

Si comparamos las formulaciones controladas entre sí, no observamos diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) (Tabla 23). El valor de $t_{1/2\lambda z}$ resulta ser similar tras la administración subcutánea del danofloxacino en la formulación SC1 y SC2 (10,27 h vs 13,49 h), demostrándose por tanto, que la adición de carboximetilcelulosa a la formulación en solución del polímero P407 al 25%, no parece aportar grandes ventajas en cuanto a obtener un mayor tiempo de permanencia de las concentraciones de danofloxacino en la oveja, aunque si consigue disminuir claramente la K_a frente a la K10, cosa que no logra de igual manera la formulación SC1.

A esta misma conclusión se llegó en el estudio de Mancebo (2011) con danofloxacino en cabras, en el que también se utilizó el polímero P407 con ambas formulaciones SC1 y SC2 y en el que no se registró diferencias significativas con la adición de carboximetilcelulosa a la formulación.

5.5.2.- TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA (MRT)

El MRT se comporta de forma diferente a las semividas descritas anteriormente. Puede observarse en las Tablas 22 y 23 la existencia de diferencias significativas entre sus valores ($p < 0,05$). En la tabla 21 se observa que el MRT es mayor en las vías extravasculares respecto la vía intravenosa. Esto indica que la permanencia del fármaco es mayor tras la administración subcutánea y aún mayor en las dos formulaciones de liberación controlada. Dado que, 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).

A continuación (Figura 4), se presentan de forma gráfica los valores de MRT de la vía intravenosa y subcutánea con y sin polímero.

En otro estudio de idénticas características en cabras y ovejas, también se ha registrado un mayor valor de MRT por la vía subcutánea respecto de la vía intravenosa

(Escudero y cols., 2007), al igual que en conejos (Fernández-Varón y cols., 2007). Por eso pudiera ser esta la vía de elección en ovejas con el fin de obtener una mayor permanencia de danofloxacino.

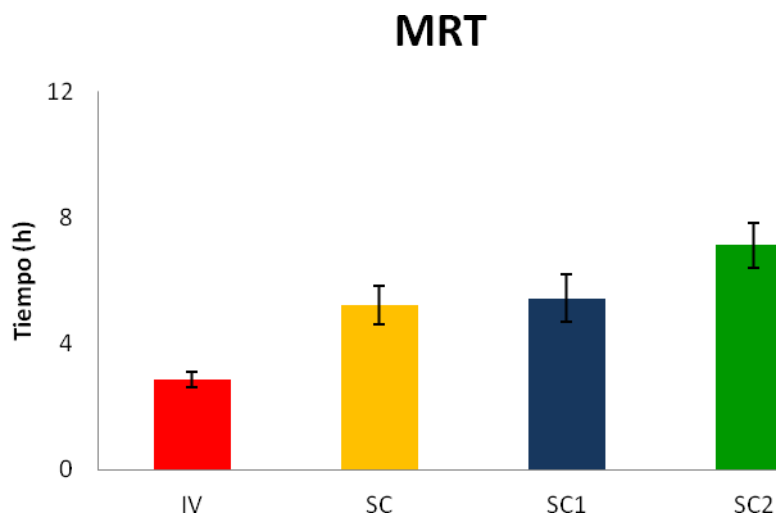


Figura 5.- Tiempo medio de residencia (MRT) obtenido en la oveja tras la administración de danofloxacino vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC) a una dosis de 6 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 18 mg/kg.

5.5.3.- CONSTANTE DE ABSORCIÓN (K_a)

Los valores medios de la constante de absorción en las diferentes vías y formas de administración de danofloxacino en ovejas se describen en la Tabla 21. Cuando comparamos los valores de k_a obtenidos en la administración subcutánea de danofloxacino sin polímero con los obtenidos en las formulaciones de liberación controlada (Tablas 22) se encuentran diferencias significativas ($p < 0,05$). Podemos observar como estas diferencias surgen cuando se compara la administración SC con las formas poliméricas. Sin embargo, entre las formulaciones SC1/SC2 no se encuentran diferencias ($p > 0,05$).

Como podemos observar, la velocidad de absorción del danofloxacino en ovejas será menor cuando se administra en formulación SC1 o SC2. Y de la misma forma ocurre en los estudios de Mancebo (2011) con danofloxacino y Titos (2010) con enrofloxacino en cabras.

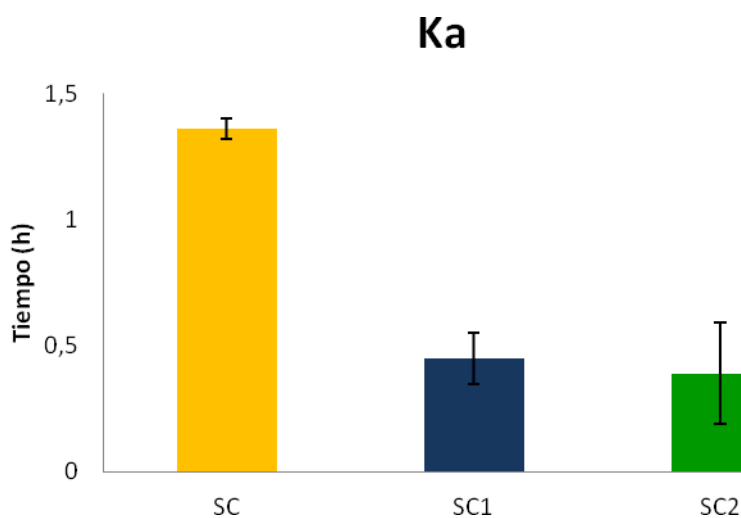


Figura 6.- Constante de absorción (k_a) obtenida en la oveja tras la administración de danofloxacino vía subcutánea (SC) a una dosis de 6 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 18 mg/kg.

5.5.4.- TIEMPO MÁXIMO ($T_{m\acute{a}x}$) Y CONCENTRACIÓN MÁXIMA ($C_{m\acute{a}x}$)

En la Tabla 21 se muestran los valores medios de $T_{m\acute{a}x}$ y $C_{m\acute{a}x}$ 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 y concentraciones de la formulación subcutánea convencional y las formulaciones de liberación controlada.

En el caso de $T_{m\acute{a}x}$, se puede ver como el valor aumenta con el uso de formas poliméricas. Si analizamos la presencia de diferencias significativas entre las distintas cifras, vemos como las diferencias surgen al comparar el $T_{m\acute{a}x}$ de la formulación SC2 con la SC, ya que no existen diferencias significativas entre las formulaciones SC1 y SC2, ni entre la SC1 y SC. El mayor valor de $T_{m\acute{a}x}$ cuando se administra en las dos

fórmulas de liberación controlada, se debe a que la absorción del danofloxacino es más prolongada, como se comentó al hablar de la K_a .

En la Figura 7, se observa de forma gráfica las diferencias existentes en el $T_{m\acute{a}x}$ para el danofloxacino en ovejas, entre las tres vías de administración subcutáneas:

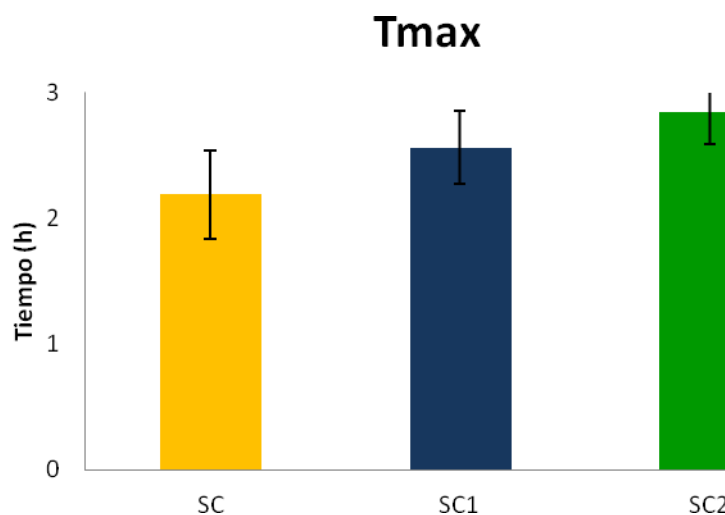


Figura 6.- Tiempo máximo ($T_{m\acute{a}x}$) obtenido en la oveja tras la administración de danofloxacino vía subcutánea (SC) a una dosis de 6 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 18 mg/kg.

En el estudio de los valores que alcanza $C_{m\acute{a}x}$ entre las formas SC, SC1 y SC2, podemos observar como con el uso de las formas poliméricas se alcanzan cifras superiores de $C_{m\acute{a}x}$ respecto de cuando se utiliza la formulación sin polímero. En la Figura 7, se observa de forma gráfica las diferencias existentes en las tres vías de administración subcutáneas, sin polímero P407, con polímero P407 y con polímero P407 más carboximetilcelulosa, con respecto a la $C_{m\acute{a}x}$ de danofloxacino en plasma. Sin embargo cabe recordar que la dosis administrada en las formulaciones poliméricas es tres veces la dosis de la formulación convencional, por eso aplicamos el factor de corrección representado en la Figura 7 (derecha). En este caso ocurre lo que es de

esperar cuando la absorción es más lenta, la $C_{m\acute{a}x}$ disminuye y la curva de nivel plasmático se hace más roma.

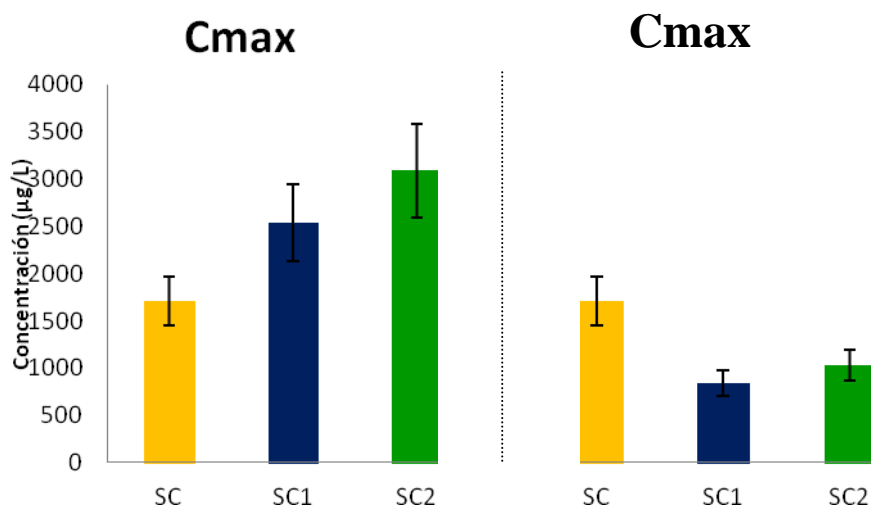


Figura 7.- Concentraciones plasmáticas máximas ($C_{m\acute{a}x}$) obtenidas en la oveja tras la administración de danofloxacino vía subcutánea (SC) a una dosis de 6 mg/kg, vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 18 mg/kg. A la derecha los valores de $C_{m\acute{a}x}$ de danofloxacino tras su administración vía SC1 y SC2 corregidos a una dosis de 5 mg/kg*.

5.5.5.- TIEMPO MEDIO DE ABSORCIÓN (MAT)

Los valores de MAT obtenidos para SC, SC1 y SC2 se detallan en la Tabla 21. Posteriormente, en la Tabla 22 se analiza la existencia o no de diferencias significativas entre los distintos valores. Podemos observar como la presencia de diferencias significativas en el valor de MAT ocurre entre las formulaciones SC2/SC y SC1/SC2 (Tabla 23), en tanto que entre SC/SC1 los valores son parecidos.

Con estos resultados, podemos afirmar que la absorción de danofloxacino resulta más lenta y que la mayor permanencia en el punto de administración consigue, a su vez, una mayor permanencia del danofloxacino en el organismo, tras la administración subcutánea de la formulación polimérica de liberación controlada SC2.

En la Figura 8, se observa de forma gráfica las diferencias existentes en las tres formulaciones subcutáneas, sin polímero P407, con polímero P407 y con polímero P407 más carboximetilcelulosa, con respecto al MAT:

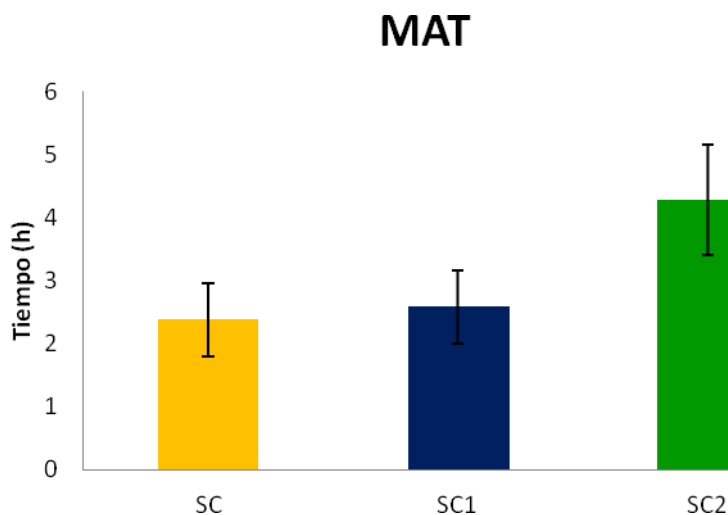


Figura 8.- Tiempo medio de absorción (MAT) obtenido en la oveja tras la administración de danofloxacino vía subcutánea (SC) a una dosis de 6 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 18 mg/kg.

5.5.6.- ÁREA BAJO LA CURVA (AUC)

La prueba no paramétrica de Kruskal Wallis (Tabla 22) pone de manifiesto la existencia de diferencias significativas en los valores de AUC obtenidos para danofloxacino cuando se compara cualquier fórmula de administración polimérica frente a una no polimérica, es decir, existen diferencias significativas entre el AUC de IV y SC frente a SC1 y SC2 (Tabla 23). Si bien, los valores de AUC obtenidos con las dos formulaciones de liberación controlada son mayores que el AUC_{iv} , debemos tener en cuenta que eso se debe a utilizar una dosis 3 veces mayor, por lo que al corregir esos AUC_{ev} a una dosis de 6 mg/kg resultan ser similares al AUC_{iv} , tal y como era de esperar.

Al comparar los valores de AUC (Figura 9, izquierda), se puede ver claramente que el AUC obtenido tras la administración subcutánea del danofloxacino con polímero es superior al AUC obtenido al administrarlo en formulaciones simples. En la Figura 9, se observa de forma gráfica las diferencias existentes en el AUC para el danofloxacino en ovejas, entre la vía intravenosa y subcutánea con y sin polímero:

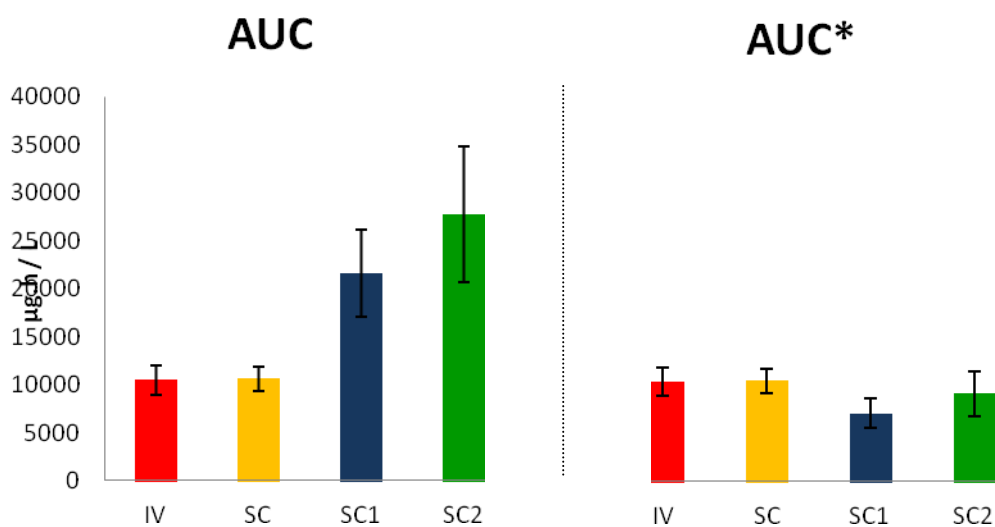


Figura 9.- Área bajo la curva de niveles plasmáticos (AUC) obtenidos en la oveja tras la administración de danofloxacino vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC) a una dosis de 6 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 18 mg/kg. En la derecha, los valores de $AUC_{0-\infty}$ de danofloxacino tras su administración vía SC1 y SC2, están corregidos a una dosis de 6 mg/kg*.

Al comparar los valores de AUC (Figura 9, derecha), se puede apreciar que el AUC cuando se corrige, en función de la dosis, no hay diferencias entre ellos.

5.5.7. BIODISPONIBILIDAD (F)

La biodisponibilidad del danofloxacino cuando se administra en alguna de las formulaciones de liberación controlada es inferior a la encontrada cuando se administra por vía subcutánea convencional (Tabla 21). La prueba de Kruskal Wallis (Tabla 22) pone de manifiesto que existen diferencias significativas ($P < 0,05$). Estas diferencias surgen cuando se compara la F obtenida en las fórmulas poliméricas frente a la simple. Sin embargo, cuando se comparan entre sí las dos fórmulas poliméricas no hay diferencias significativas según la prueba de U de Man-Whitney (Tabla 23).

En la Figura 10, se observa de forma gráfica las diferencias existentes en la biodisponibilidad de las tres formulaciones subcutáneas, sin polímero P407, con polímero P407 y con polímero P407 más carboximetilcelulosa:

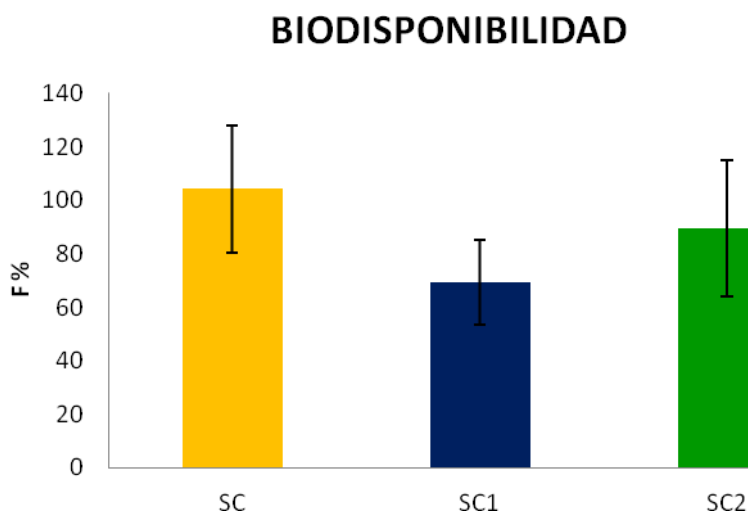


Figura 10.- Biodisponibilidad obtenida en la oveja tras la administración de danofloxacino vía subcutánea (SC) a una dosis de 6 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 18 mg/kg.

5.6.- ESTUDIO FARMACOCINÉTICO DE LA EXCRECIÓN EN LECHE DE DANOFLOXACINO

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).

Danofloxacin, como otras fluoroquinolonas, es una molécula anfótera con un pK_{a1} de 6,07 y un pK_{a2} de 8,56 (Martínez y cols., 2006). El pH de la leche de oveja tiene un rango entre 6,6 y 6,8, muy cercano al punto isoelectrico teórico de danofloxacin ($pI = 6,54$), 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).

5.6.1.- EVOLUCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE DANOFLOXACINO EN LECHE: ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA

La evolución de las concentraciones individuales y medias (\pm SD) experimentales de danofloxacin obtenidas en leche de oveja tras la administración de una dosis de 6 mg/kg vía intravenosa se muestran en los Gráficos 11 y 12, en los que se pueden observar como se detectan concentraciones hasta las 48 h posteriores a la administración del fármaco. En la Tabla 25 se incluyen los resultados del análisis de la varianza no paramétrico que indican que las concentraciones de danofloxacin 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 13 y 14, respectivamente. Se puede observar como las concentraciones en leche del fármaco son superiores a las plasmáticas en todos los animales, puede observarse que los niveles promediados en leche son superiores a los plasmáticos desde las 2 horas hasta las 48 horas.

5.6.1.1- TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA (MRT)

El valor de MRT que se alcanza en leche es de 4,10 h, que comparado con el obtenido en plasma de 2,86 h, indica que las concentraciones alcanzadas en leche son más persistentes que las plasmáticas.

Si comparamos con los datos obtenidos en cabras para marbofloxacino administrado por vía intravenosa a dosis de 2 mg/kg (Fernández, 2013), observamos como el MTR de la leche también es superior al del plasma (5,05 h frente a 3,02 h, respectivamente). Y el mismo fenómeno se repite en el estudio con enrofloxacino en cabras (Titos Arcos 2010), a dosis de 5 mg/kg por vía intravenosa, que reporta unos valores de MRT en leche en torno a 4,30 h, y 2,86 h en plasma.

5.6.1.2- 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 2,00 h (Tabla 27), que resulta ser similar a algunos de los valores hallados para otras fluoroquinolonas administradas en cabras vía intravenosa. Así, para moxifloxacino, enrofloxacino, difloxacino, se obtuvieron valores de 2,17 h, 1,6 h y 1,16 h respectivamente (Fernández, 2013, Titos Arcos 2010, Marín y cols., 2010).

En cuanto a la $C_{m\acute{a}x}$ en leche, el valor obtenido tras la administración intravenosa a ovejas de una dosis de 6 mg/kg, ha sido de 28734,58 $\mu\text{g/L}$ (Tabla 27).

La cifra obtenida supera en casi 13 veces a los valores reportados por enrofloxacino en cabras, a una dosis de 5mg/kg (2354,63 $\mu\text{g/L}$, Titos, 2010), o en 23 veces si se compara con el valor obtenido para marbofloxacino en el estudio de Fernández (1253,41 $\mu\text{g/L}$, 2013) a dosis de 2 mg/kg.

En la bibliografía ya se han reportado casos en los que la concentración de danofloxacino en leche de oveja es 10 veces superior a la plasmática (Shem-Tov y col., 1997, Escudero y cols., 2007).

Una posible explicación a este hecho podría ser la existencia de los transportadores ATP-Binding Cassette (ABC). Estos comprenden una superfamilia de transportadores de eflujo ATP-asa localizados en la membrana celular, los cuales se relacionan con la movilización de fármacos.

La hipótesis más apoyada por los diferentes autores, se basa en el transporte de danofloxacino a través de estas proteínas, las cuales tienen alta expresión en el tejido mamario, entre otros, y particularmente durante la lactancia. Esto ha sido demostrado en ganado ovino y bovino (Pulido y cols., 2006; Pérez M., y cols., 2012).

Se conoce un número limitado de estos transportadores, pero los que se han relacionado con el transporte de moléculas medicamentosas a través de ellos son: ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC4 y ABCG2.

Concretamente, la Proteína de Resistencia al Cáncer de Mama, conocida como BCRP o ABCG2, es uno de los miembros recientemente descubiertos de la superfamilia de transportadores ABC, y es ésta la que ha mostrado en distintos estudios *in-vitro*, estar relacionada con la excreción de fármacos, entre ellos las flouoroquinolonas.

Las flouoroquinolonas como enrofloxacino, ciprofloxacino o danofloxacino, han demostrado ser sustrato para múltiples receptores ABC, pero el que se relaciona con la excreción de estos fármacos a leche ha sido BCRP/ ABCG2 (Merino y cols., 2006; Pulido y cols., 2006; Schrickx and Fink-Gremmels, 2008). Teniendo en cuenta la elevada excreción del danofloxacino, superior al de otras fluoroquinolonas, quizá presente una mayor afinidad por estos transportadores.

Pulido y cols. (2006) midieron, en estudios *in-vitro*, la actividad ATP-asa de BCRP/ ABCG2 de origen murino y humano en el transporte de enrofloxacino. Los resultados mostraron una alta eficiencia en el transporte del fármaco para el de origen murino y moderada eficiencia en el humano. En cualquier caso, su estudio fue más allá y analizaron el papel de las isoflavonas de soja en la secreción de enrofloxacino ya que recientemente se ha observado que los polifenoles presentes en vegetales y plantas, los cuales también están presentes en el forraje de los rumiantes, interaccionan con BCRP (Cooray y cols., 2004; Zhang y cols., 2004).

Analizaron la concentración de enrofloxacino en leche de oveja, así como sus parámetros farmacocinéticos, tras administrar una dosis de 2,5 mg/kg (grupo 1), co-administrado con genisteína (0,8 mg/kg intramuscular, grupo 2) y sulfóxido de albendazol (2 mg/kg, intravenoso, grupo 3). En los resultados se observó un descenso significativo en la secreción de enrofloxacino tras la administración de los inhibidores de BCRP (Pulido y cols., 2006).

5.6.1.3.- ÁREA BAJO LA CURVA (AUC) y RATIO $AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{plasma}}$

Otro parámetro de interés es el área bajo la curva de concentración en leche-tiempo (AUC_{leche}), obtenido tras la administración intravenosa del danofloxacino a una dosis de 6 mg/kg, y que alcanza un valor de 137643,92 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ (Tabla 27). Un valor muy superior, concretamente 20 veces superior, al obtenido en el estudio de Escudero y cols. (6690 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$, 2007) con danofloxacino intravenoso en ovejas a la misma dosis que nuestro estudio.

Si comparamos con el valor de AUC obtenido para otras flouoroquinolonas y en otras especies animales, marbofloxacino, a dosis de 2 mg/kg vía intravenosa en cabras, presenta un valor de AUC de 6239,43 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ (Fernández, 2013), 22 veces inferior, y enrofloxacino, también en cabras a dosis de 5 g/kg, vía intravenosa, de 9292,28 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$, casi 15 veces inferior al nuestro.

Este parámetro puede utilizarse para estimar la penetración del fármaco en leche mediante la relación $AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{plasma}}$, cuyo valor es de 12,81 (Tabla 27), esta cifra lo que indica es su alta penetración en leche.

De los pocos estudios que hay, las cifras que más se aproximan a las nuestras, aun siendo inferiores, son las de Pérez y cols., (2012). En dicho trabajo, administraron como dosis única 1,25 mg/kg de danofloxacino, vía intramuscular a ovejas, y obtuvieron un valor de AUC en leche de 16580 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$, 10 veces superior al AUC obtenido en plasma (1700 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$). La ratio $AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{plasma}}$ fue de 9,58.

En otro estudio en ovejas (Pulido y cols., 2006) explicado anteriormente, se obtuvo un valor de AUC para enrofloxacino de 10170 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ y una ratio $AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{plasma}}$ de 0,75, cifras muy por debajo de las obtenidas en el nuestro.

5.6.1.4.- CANTIDAD TOTAL DE DANOFLOXACINO EXCRETADA EN LECHE

La cantidad total eliminada en leche tras la administración intravenosa de una dosis de 6 mg/kg de danofloxacino, ha supuesto un 1,81%, respecto de la dosis total administrada (Tablas 27).

Un valor parecido se obtuvo en el estudio de Pérez y cols. (2012), 1,56%. Sin embargo, no debemos olvidar que en este estudio la vía de administración fue

intramuscular y la que nos ocupa en este apartado es la intravenosa, pero recurrimos a este estudio porque es el único con cifras comparables a las nuestras.

Si analizamos los valores reportados para otras fluoroquinolonas administradas por ejemplo en cabras, las cifras son muy inferiores y nada comparables. Es el caso de ibafloxacino y orbifloxacino, que se eliminaron 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., 2007) o para marbofloxacino tras administrar una dosis de 2 mg/kg, 1,03% (Fernández, 2013).

5.6.2.- EVOLUCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE DANOFLOXACINO EN LECHE: ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA

La evolución de las concentraciones individuales y medias (\pm SD) experimentales de danofloxacino obtenidas en leche de oveja tras la administración de una dosis de 6 mg/kg vía subcutánea aparecen en los Gráficos 15 y 16, en los que se pueden observar como se detectan concentraciones hasta las 48 h posteriores a la administración del fármaco. Los valores de concentraciones individuales y medias (media \pm SD) en leche aparecen en la Tablas 28. En la Tabla 29 se detallan los resultados del análisis de la varianza (Prueba de Levene) que indican que las concentraciones de danofloxacino detectadas en leche, a sus correspondientes tiempos de ordeño, no varía entre animales, pero sí entre tiempos.

5.6.2.1.- TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA (MRT)

En el presente estudio, este parámetro alcanza un valor de 6,85 h (Tabla 31), 1,7 veces superior al valor de MRT obtenido en leche en la vía intravenosa (4,10 h, Tabla 27). Por tanto, se deduce que las concentraciones alcanzadas en leche tras la administración subcutánea son más persistentes que cuando se administra el danofloxacino vía intravenosa.

5.6.2.2.- TIEMPO MÁXIMO ($T_{m\acute{a}x}$) Y CONCENTRACIÓN MÁXIMA ($C_{m\acute{a}x}$)

El $T_{m\acute{a}x}$ obtenido para danofloxacino en ovejas ha sido de 3,20 h (Tabla 31), algo superior al obtenido por vía intravenosa (2h, Tabla 27). 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.

Para otras fluoroquinolonas administradas en otras especies animales por vía subcutánea, se han descrito valores idénticos de $T_{m\acute{a}x}$. Es el caso de enrofloxacin en cabras (3,2 h, Titos, 2010). Se describen cifras inferiores para marbofloxacin (2,3 h, Fernández, 2013) u orbifloxacin (2 h, Marín y cols, 2007a) y cifras superiores para difloxacin (4 h, Marín y cols., 2007c).

En cuanto a la $C_{m\acute{a}x}$ en leche, el valor obtenido para el danofloxacin en oveja tras la administración de una dosis de 6 mg/kg ha sido de 20344,02 $\mu\text{g/L}$ (Tabla 31), ligeramente inferior al intravenoso (28734,58 $\mu\text{g/L}$, Tabla 27), pero siguiendo la misma línea, se trata de concentraciones muy por encima de las descritas en la bibliografía.

Por ejemplo, en el estudio con orbifloxacin, se obtuvieron cifras de $C_{m\acute{a}x}$ en leche entorno a 1730 $\mu\text{g/L}$ (Marín y cols., 2007a), similares a las obtenidas con enrofloxacin de 1679,98 $\mu\text{g/L}$ (Titos, 2010). Estas cifras nos muestran que la $C_{m\acute{a}x}$ obtenida en nuestro estudio es 11 y 12 veces superior, respectivamente, a las anteriores fluoroquinolonas. Igual ocurre con difloxacin, la $C_{m\acute{a}x}$ hallada en leche de cabra cuando se administró vía subcutánea fue de 1200 $\mu\text{g/L}$ (Marín y cols., 2007c).

De nuevo hay que recurrir a la hipótesis de los receptores BCRP/ ABCG2 para explicar estos valores, y a una posible alta afinidad del danofloxacin por los mismos, aunque no se dispone de bibliografía que haya estudiado danofloxacin en ovejas administrado por vía subcutánea.

5.6.2.3.- ÁREA BAJO LA CURVA (AUC) y RATIO AUC_{leche}/AUC_{plasma}

El área bajo la curva de concentración en leche-tiempo (AUC), obtenido tras la administración subcutánea del danofloxacin a una dosis de 6 mg/kg, alcanza un valor de 141254,7 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ (Tabla 31), valor algo superior al descrito para la vía intravenosa, el cual fue de 13764,92 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ (Tabla 27).

Si comparamos nuestro valor con el que obtuvieron en el estudio de Escudero y cols. (2007), al administrar una dosis de 6 mg/kg de danofloxacin a ovejas y cabras comprobamos de nuevo como nuestro valor está muy por encima del reportado por ellos, concretamente 21 y 26 veces, respectivamente (6690 y 5370 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$).

Continuando con la comparativa del AUC, se puede observar como a pesar de la gran diferencia en valor absoluto, el AUC obtenido para la vía subcutánea es superior al

obtenido para la vía intravenosa y ocurre el mismo fenómeno para el enrofloxacin (AUC_{leche iv} = 9292,28 y 6360 µg·h/L respectivamente; Titos, 2010) y orbifloxacin en cabras (AUC_{leche sc} = 9999,04 y 7580 µg·h/L respectivamente; Marín y cols., 2007a). La cifra obtenida tras la administración subcutánea es mayor a la de la vía intravenosa. Pero también ocurre lo contrario, para difloxacin vía subcutánea, se describió un valor de AUC en leche de 114600 µg·h/L frente a los 15100 µg·h/L intravenosos (Marín y cols., 2010).

Este parámetro nos permite, al igual que en la vía intravenosa, calcular la penetración del danofloxacin en leche tras la administración de una dosis de 6 mg/kg vía subcutánea. Para ello se calcula la ratio que relaciona las AUC en leche/plasma del fármaco, obtenidas tras su administración subcutánea.

El valor de dicha ratio AUC_{leche}/AUC_{plasma} ha sido de 13,53 (Tabla 31), ligeramente superior a los 12,81 alcanzados por vía intravenosa (Tabla 27), y que induce a pensar que podría existir acumulación del fármaco en leche.

Si nos fijamos en este ratio AUC_{leche}/AUC_{plasma} para otras fluoroquinolonas, se han descrito valores de nuevo muy inferiores a los hallados en nuestro estudio. Así, moxifloxacin, orbifloxacin y difloxacin en cabras, reportan valores de AUC_{leche}/AUC_{plasma} de 2,33, 1,15 y 0,68, respectivamente (Fernández-Varón y cols., 2006a; Marín y cols., 2007a; Marín cols., 2007c).

5.6.2.4.- RATIO C_{máx-leche}/C_{máx-plasma}

Otro parámetro que nos permite estimar la penetración del fármaco en leche, al igual que la ratio AUC_{leche}/AUC_{plasma}, es la ratio C_{máx-leche}/C_{máx-plasma} tras la administración de una dosis de 6 mg/kg vía subcutánea. Para ello se calcula la ratio que relaciona la C_{máx} en leche obtenida tras la administración subcutánea con las C_{máx} plasmáticas del fármaco.

El valor de la ratio C_{máx-leche}/C_{máx-plasma} ha sido de 12,04 (Tabla 31), resultado similar al obtenido para la ratio AUC_{leche}/AUC_{plasma} de 13,53 (Tabla 31). Esta ratio, al igual que la ratio AUC_{leche}/AUC_{plasma}, nos indicaría lo mismo, es decir, que la penetración del danofloxacin en leche es alta, lo que induce a pensar que pueda existir cierta acumulación del antibiótico en leche.

Ratios inferiores a los descritos por nosotros han sido publicados para enrofloxacino y marbobloxacino en cabras tras ser administrados vía subcutánea, concretamente 0,76 y 0,81, respectivamente (Titos, 2010; Fernández, 2013). También para orbifloxacino y difloxacino, 0,95 y 0,90, respectivamente (Marín y cols., 2007a; Marín cols., 2007c).

5.6.2.5.- CANTIDAD TOTAL DE DANOFLOXACINO ELIMINADA EN LECHE

La cantidad total de fármaco eliminado en leche tras su administración por vía subcutánea a una dosis de 6 mg/k, ha supuesto un 1,50% del total de la dosis, frente al 1,71% intravenoso.

Valores inferiores a los descritos en nuestro estudio, han sido reportados para otras fluoroquinolonas administradas en otros animales. Por ejemplo, la cantidad total de enrofloxacino eliminada en leche de cabra tras la administración subcutánea de una dosis de 5 mg/kg de enrofloxacino, supuso un 0,24% frente al 0,27% hallado para la vía intravenosa (Titos, 2010), o para moxifloxacino y difloxacino, tras administrar una dosis de 5 mg/kg, 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). Para el caso de marbofloxacino a una dosis de 2 mg/kg, se reportó una eliminación en leche cercana al 0,65% respecto de la dosis total.

5.6.3.- EVOLUCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE DANOFLOXACINO EN LECHE: ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA EN SOLUCIÓN DEL POLÍMERO P407 AL 25%

Los valores de las concentraciones individuales y medias (media \pm SD) experimentales de danofloxacino obtenidas en leche de oveja, tras la administración de una dosis de 18 mg/kg en formulación SC1 vía subcutánea, se muestran en la Tabla 32. En la Tabla 33 se incluyen los resultados del análisis de la varianza no paramétrico (test de Levene) que indican que las concentraciones de danofloxacino detectadas en leche, a sus correspondientes tiempos de ordeño, no varían entre animales, pero si entre tiempos.

Estas cifras obtenidas, se representan en los Gráficos 19 y 20. Se trata de la evolución de las concentraciones individuales y medias (media \pm SD) experimentales de

danofloxacino obtenidas en leche de oveja. Se puede observar como se detectan concentraciones hasta las 72 h posteriores a la administración en todos los animales.

En la Tabla 35 se muestran los parámetros farmacocinéticos no compartimentales, obtenidos para la leche, deducidos tras la administración subcutánea de danofloxacino en solución del polímero P407 al 25%, a dosis de 18 mg/kg, a cada una de las ovejas junto con sus estadísticos de desviación.

En la bibliografía sólo existen estudios farmacocinéticos de las concentraciones de enrofloxacino, difloxacino y marbofloxacino 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 compararán con esas publicaciones (Titos, 2010, Marín y cols., 2010 y Fernández, 2013).

5.6.3.1.- TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA (MRT)

Tras la administración de una dosis de 18 mg/kg en formulación SC1, el MRT alcanza un valor de 7,49 h (Tabla 35). Esta cifra es 1,8 y 1,1 veces superior a la descrita para la vía intravenosa y subcutánea respectivamente (4,10 h y 6,85 h, Tabla 27 y 31). Si comparamos los valores de MRT con los de los otros estudios, podemos observar como para el marbofloxacino en cabras, a una dosis de 6 mg/kg, se obtienen cifras muy parecidas: un MRT en formulación SC1 de 7,54 h frente a 5,05 y 5,16 h para la vía intravenosa y subcutánea respectivamente (Fernández, 2013). Es decir, el MRT de la formulación SC1 resulta ser 1,5 veces superior al descrito para la vía intravenosa y subcutánea.

Una cifra superior se obtuvo en el estudio de enrofloxacino tras la administración de una dosis de 15 mg/kg en formulación SC1 (11,41 h), resultando ser 2,7 veces superior al descrito para la vía intravenosa (4,30 h) y 2,28 veces al hallado tras su administración subcutánea sin polímero (5,45h) (Titos, 2010).

Si comparamos este valor de MRT con el hallado en plasma con la formulación SC1, que fue 5,23 h (Tabla 10), de nuevo comprobamos que las concentraciones en leche son más persistentes que en plasma, igual que ocurre en la administración subcutánea sin polímero.

5.6.3.2.- 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 3 h (Tabla 35). Este parámetro es independiente de la dosis administrada, pero sí se modifica en función de la forma farmacéutica administrada y la vía de administración.

Esta cifra es parecida a la obtenida tras la administración subcutánea (3,2 h), y si comparamos con el valor de $T_{m\acute{a}x}$ obtenido para otras flouoroquinolonas en cabras podemos observar como también hay pocas diferencias. En el estudio de enrofloxacino se obtuvo un valor de $T_{m\acute{a}x}$ de 3,2 h (Titos, 2010), 3,6 h para difloxacino (Marín y cols., 2010) y 4 h para marbofloxacino (Fernández, 2013).

En cuanto a la $C_{m\acute{a}x}$ en leche, el valor obtenido ha sido de 44370,58 $\mu\text{g/L}$, que es prácticamente el doble que el alcanzado por vía subcutánea sin polímero y 1,5 veces al de la vía intravenosa (20344,02 y 28734,58 $\mu\text{g/L}$, respectivamente), aunque hay que recordar que en estos casos se administró una dosis de 6 mg/kg.

De nuevo se trata de cifras nada comparables con las obtenidas en otros estudios. Por ejemplo, marbofloxacino en cabras reportó una cifra en torno a 3074,37 $\mu\text{g/L}$ (Fernández, 2013), casi 15 veces inferior a la nuestra, o enrofloxacino en cabras, también tras la administración con la formulación SC1, 22275,26 $\mu\text{g/L}$, 20 veces inferior (Titos, 2010).

5.6.3.3.- 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 danofloxacino a 18 mg/kg ha sido de 262664,38 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ (Tabla 35). Valor superior al hallado cuando administramos el fármaco vía intravenosa y subcutánea sin polímero, concretamente casi 1,9 veces superior en ambos casos (137643,92 y 141254,76 respectivamente). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la dosis administrada en las vías intravenosa y subcutánea sin polímero fue de 6 mg/kg, tres veces inferior. De manera que, corrigiendo estas diferencias, se obtiene un valor de AUC en leche teórico a 6 mg/kg de 87554,66 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$, una cifra, en este caso, inferior a las anteriores.

A partir de este parámetro, al igual que en anteriores vías, calcularemos la penetración del danofloxacino en leche, tras la administración de una dosis de 18 mg/kg

de danofloxacino en formulación SC1 vía subcutánea. Para ello se calcula la ratio que relaciona las áreas bajo la curva de concentración en leche-tiempo obtenida tras la administración subcutánea en formulación SC1, con las áreas totales bajo la curva de concentración plasmática.

El valor de la ratio $AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{plasma}}$ ha sido de 25,42 (Tabla 35). Este valor indica, al igual que las anteriores ratios calculadas para la vía intravenosa y subcutánea sin polímero, que la penetración del danofloxacino en leche tras la administración en formulación SC1 es alta, aun más si cabe que con respecto de las anteriores vías.

Y continuando con la misma tendencia, el valor de la ratio $AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{plasma}}$ obtenido para el danofloxacino ha sido superior al obtenido para otras flouroquinolonas en otras especies animales como la cabra. Si comparamos con la cifra obtenida para enrofloxacino o difloxacino, nuestro ratio es 33 veces superior a ambas (0,67, Titos, 2010; 0,92, Marín y cols., 2010).

5.6.3.4.- RATIO $C_{\text{máx-leche}}/C_{\text{máx-plasma}}$

Otro parámetro que nos permite, calcular la penetración del danofloxacino 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 18 mg/kg de danofloxacino vía subcutánea en formulación SC1.

El valor de la ratio $C_{\text{máx-leche}}/C_{\text{máx-plasma}}$ ha sido de 17,38 (Tabla 35), resultado inferior al obtenido para la ratio $AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{plasma}}$ de 25,42 (Tabla 35).

Esta ratio al igual que la ratio $AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{plasma}}$, nos indicaría lo mismo, es decir, que la penetración del danofloxacino en leche es muy alta, lo que induce a pensar que pueda existir acumulación del antibiótico en leche.

Al comparar con la ratio $C_{\text{máx-leche}}/C_{\text{máx-plasma}}$ obtenida para la vía subcutánea sin polímero ($C_{\text{máx-leche}}/C_{\text{máx-plasma sc}} = 12,04$, Tabla 31), se puede observar como la penetración del danofloxacino es superior cuando se administra vía subcutánea con polímero.

5.6.3.5.- CANTIDAD TOTAL DE DANOFLOXACINO Y ELIMINADA EN LECHE

La cantidad total de danofloxacino eliminada en leche tras la administración subcutánea de una dosis de 18 mg/kg en formulación SC1, ha supuesto un 1,71% de la cantidad administrada (Tabla 35).

Este valor es algo superior al obtenido para la vía subcutánea sin polímero de 1,50%, y similar al descrito para la vía intravenosa, que fue de 1,81%. Por tanto, la cantidad eliminada por leche de danofloxacino cuando se administra por vía subcutánea con polímero, no difiere mucho de cuando se administra por vía intravenosa y subcutánea sin polímero.

5.6.4.- EVOLUCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE DANOFLOXACINO EN LECHE: ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA EN SOLUCIÓN DEL POLÍMERO P407 AL 25% MÁS CARBOXIMETILCELULOSA AL 2%

En la Tabla 36 se detallan los valores de las concentraciones individuales y medias (media \pm SD) experimentales de danofloxacino obtenidas en leche de oveja, tras la administración de una dosis de 18 mg/kg en formulación SC2 vía subcutánea. En la Tabla 37 se incluyen los resultados del análisis de la varianza no paramétrico (test de Levene) que indican que las concentraciones de danofloxacino detectadas en leche, a sus correspondientes tiempos de ordeño, no varía entre animales, pero si entre tiempos.

La representación gráfica de estos valores se muestra en los Gráficos 23 y 24. Se trata de la evolución de las concentraciones individuales y medias (media \pm SD) experimentales de danofloxacino obtenidas en leche de oveja y se puede observar como se detectan concentraciones de hasta las 72 h posteriores a la administración en las ovejas A, D y E.

En la Tabla 39 se muestran los parámetros farmacocinéticos no compartimentales, obtenidos para la leche, deducidos tras la administración subcutánea de danofloxacino en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa, a dosis de 18 mg/kg, a cada una de las ovejas junto con sus estadísticos de desviación.

Al igual que comentamos con la formulación SC1, en la literatura sólo existen estudios farmacocinéticos de las concentraciones de enrofloxacin, difloxacin y marbofloxacin en leche de cabras, tras su administraci3n en f3rmulas de liberaci3n controlada como es el pol3mero P407 m3s carboximetilcelulosa, por lo que los par3metros farmacocin3ticos obtenidos se compararán con esas publicaciones (Titos, 2010, Mar3n y cols., 2010 y Fern3ndez, 2013).

5.6.4.1.- TIEMPO MEDIO DE RESIDENCIA (MRT)

Tras la administraci3n de una dosis de 18 mg/kg de la formulaci3n SC2, el MRT alcanza un valor de 8,29 h (Tabla 39). Este valor de MRT obtenido en leche tras su administraci3n en formulaci3n SC2 es el doble al descrito para la v3a intravenosa y 1,4 h superior al de la v3a subcut3nea sin pol3mero (4,10 h y 6,85 h, Tabla 27 y 31). Sin embargo, es similar al obtenido en leche cuando se administra en formulaci3n SC1. En este caso la diferencia es de 0,8 h (7,49 h; Tabla 35).

Al igual que hac3amos para anteriores v3as, podemos comparar este valor de MRT obtenido en leche con el hallado en plasma con la misma formulaci3n, que fue de 7,13 h (Tabla 20). Como se puede observar, al igual que ocurr3a en la v3a subcut3nea con el pol3mero P407, los valores de MRT son m3s elevados en leche que en plasma.

5.6.4.2.- TIEMPO M3XIMO (T_{m3x}) Y CONCENTRACI3N M3XIMA (C_{m3x})

El valor obtenido para T_{m3x} , tras la administraci3n subcut3nea del danofloxacin en formulaci3n SC2, ha sido de 4 h (Tabla 39).

Este resultado de T_{m3x} es superior en 1 h, al obtenido tras su administraci3n subcut3nea en formulaci3n SC1, de 3 h (Tabla 35). Diferencia m3s grande se encuentra si lo comparamos con el valor de T_{m3x} tras la administraci3n intravenosa y subcut3nea sin pol3mero. Para la v3a intravenosa se obtuvo un valor de 2 h (Tabla 27), 2 horas inferior, y para la subcut3nea sin pol3mero se hall3 un valor de 3,2 h (Tabla 31), inferior en 0,8 h.

Comparando el valor de T_{m3x} obtenido con otras fluoroquinolonas, en otras especies animales; para enrofloxacin en cabras, se obtuvo que, con la formulaci3n SC2 se alcanz3 un valor de 6 h frente a 5,6, 3,2 y 1,3 h respectivamente, tras su administraci3n subcut3nea con y sin pol3mero e intravenosa (Titos, 2010). En el caso de

difloxacino (Marín y cols., 2010), el valor de $T_{m\acute{a}x}$ con la formulación SC2 fue idéntico, 4h, frente a 3,6 h, 4 h y 1,16 h tras su administración subcutánea con y sin polímero e intravenosa. Y si lo comparamos con las cifras reportadas para marbofloxacino de 4,2, 4, 2,17 h y 2,33 h (Fernández, 2013) respectivamente, para las distintas vías, podemos observar como danofloxacino no es una excepción y el valor de T_{max} obtenido en leche con la formulación SC2 resulta superior al del resto de formulaciones.

En cuanto a la $C_{m\acute{a}x}$ en leche, el valor obtenido en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% en ovejas ha sido de 30829,29 $\mu\text{g/L}$ (Tabla 39). Esta cifra es inferior y superior en 1,5 veces a la obtenida tras la administración de danofloxacino con la formulación SC1 y SC respectivamente (44370,58 y 20344,02 $\mu\text{g/L}$, respectivamente). Sin embargo, el valor de $C_{m\acute{a}x}$ que más se parece al obtenido para la formulación SC2 es el obtenido en la vía intravenosa (28734,02 $\mu\text{g/L}$) y hay que tener en cuenta que la dosis utilizada ha sido tres veces superior (18 mg/kg frente a 6 mg/kg).

La bibliografía que se dispone acerca de otras fluoroquinolonas, reportan cifras de $C_{m\acute{a}x}$ muy inferiores y nada comparables con las obtenidas en nuestro estudio. Para el caso de enrofloxacino a 15 mg/kg en cabras el valor de $C_{m\acute{a}x}$ ronda los 2162,29 $\mu\text{g/L}$ (Titos, 2010), 2910 $\mu\text{g/L}$ para difloxacino (Marín y cols., 2010) y 2282 $\mu\text{g/L}$ para marbofloxacino (Fernández, 2013).

5.6.4.3.- ÁREA BAJO LA CURVA (AUC) y RATIO AUC_{leche}/AUC_{plasma}

El AUC en leche-tiempo, obtenido tras la administración subcutánea del danofloxacino en formulación SC2 a una dosis de 18 mg/kg, alcanza un valor de 282790,95 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ (Tabla 39).

Al igual que ocurría en anteriores vías de administración intravenosa, subcutánea y subcutánea con polímero P407, el valor de AUC en leche es muy superior al obtenido en plasma. Concretamente en este caso, si comparamos el AUC plasmático obtenido con la formulación SC2 (27728,93 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$, Tabla 20) con el AUC de la leche con la misma formulación, podemos observar que es 10 veces superior.

Diferencias menores se pueden observar al compararlos con sus respectivos valores para la vía intravenosa, subcutánea sin polímero y subcutánea SC1. Así, en el caso de la vía intravenosa y subcutánea sin polímero, el AUC es 2 veces superior y

parecido para la fórmula SC1 (137643,92, 141254,76 y 262664,38 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$; Tablas 27, 31 y 35 respectivamente).

A partir de este parámetro, al igual que en anteriores vías, calcularemos la penetración de danofloxacino en leche, tras la administración de una dosis de 18 mg/kg en formulación SC2 vía subcutánea, mediante 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.

El valor de la ratio $AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{plasma}}$ ha sido de 27,12 (Tabla 39). Este valor indica, al igual que en anteriores ratios calculadas, que la penetración de danofloxacino en leche tras la administración con la formulación SC2 es aun más alta si cabe, como se puede observar con vías anteriores ($AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{plasma iv}} = 12,81$, Tabla 27; $AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{plasma sc}} = 13,53$, Tabla 31; $AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{plasma sc P407}} = 25,42$, Tabla 35) sería la más elevada.

5.6.4.4.- 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 18,11 (Tabla 39). Resultado superior al obtenido para las formulaciones anteriores de 4,73 y 12,04 para las vías intravenosa y subcutánea sin polímero, y 17,38 de la formulación SC1.

Esta ratio al igual que la ratio $AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{plasma}}$, nos indicaría lo mismo, es decir, que la penetración de danofloxacino en leche es muy alta e induce a pensar que existe acumulación del antibiótico en leche.

Otra vez, la cifra obtenida en nuestro estudio es muy superior a la reportada para otras fluoroquinolonas. Por ejemplo enrofloxacino y difloxacino reportaron cifras entorno a 0,89 y 0,86 respectivamente (Titos, 2010, Marín y cols., 2010) y marbofloxacino 1,13 (Fernández, 2013).

5.6.4.5.- CANTIDAD TOTAL DE DANOFLOXACINO ELIMINADA EN LECHE

La cantidad total de danofloxacino eliminada en leche tras la administración subcutánea de una dosis de 18 mg/kg en formulación SC2, han supuesto un 0,84% de la dosis administrada (Tabla 39).

Este valor es inferior al obtenido tras la administración como formulación SC1. Además también es inferior al obtenido tras la administración intravenosa y subcutánea de danofloxacino.

5.7.- COMPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES EN LECHE ENTRE ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA, SUBCUTÁNEA Y SUBCUTÁNEA DE DANOFLOXACINO EN: SOLUCIÓN DEL POLÍMERO P407 AL 25% Y EN SOLUCIÓN DEL POLÍMERO P407 AL 25% MÁS CARBOXIMETILCELULOSA AL 2%

La evolución de las concentraciones en leche de danofloxacino tras las diversas vías de administración de este estudio, puede observarse gráficamente en los Gráficos 37 y 38, para todas las vías y para las extravasculares, respectivamente. Los parámetros farmacocinéticos no compartimentales se muestran en la Tabla 40 y en la Tabla 41 se muestran los resultados del estudio comparativo no paramétrico (prueba de Kruskal-Wallis) entre ellos.

El estudio comparativo no paramétrico (U de Mann-Whitney) entre los principales parámetros farmacocinéticos no compartimentales y ratios leche plasma para las distintas vías, se muestra en la Tabla 42.

Con todo esto continuamos en el estudio, comparando los distintos parámetros farmacocinéticos.

5.7.1.- 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 ($p < 0,05$). Como se puede apreciar (Tabla 40), la presencia de danofloxacino en leche es más prolongada cuando se administra el fármaco vía subcutánea en formulación SC2 y SC1, pudiendo ser por tanto, estas vías las de elección a fin de obtener concentraciones del fármaco en leche durante un mayor periodo de tiempo. Hay que indicar además que, la diferencia de tiempo entre un mínimo de 4,10 h y un máximo de 8,29 h, es de aproximadamente el doble, por lo que desde un punto de vista práctico, la elección de una formulación dada debe ser un criterio a tener en cuenta.

A continuación (Figura 11), se presentan los valores de MRT de forma gráfica, para danofloxacino en los casos estudiados:

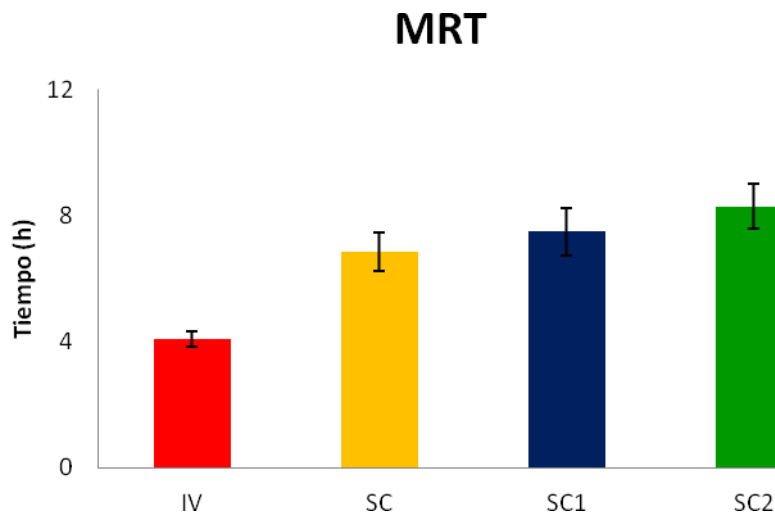


Figura 11.- Tiempo medio de residencia (MRT) de danofloxacino en leche obtenido en la oveja tras la administración vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC) a una dosis de 6 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 18 mg/kg.

5.7.2.- TIEMPO MÁXIMO ($T_{m\acute{a}x}$) Y CONCENTRACIÓN MÁXIMA ($C_{m\acute{a}x}$)

La Tabla 41 pone de manifiesto que no existen diferencias significativas en el valor de $T_{m\acute{a}x}$ pero si en el de $C_{m\acute{a}x}$. Los valores de $C_{m\acute{a}x}$ resultan ser estadísticamente diferentes ($p < 0,05$) entre las administraciones de la formulación convencional y entre las dos formulaciones de liberación controlada. Por tanto, ambas alcanzan su $C_{m\acute{a}x}$ en leche a tiempos parecidos.

En las siguientes figuras (12 y 13), se observa de forma gráfica las diferencias existentes para el danofloxacino (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:

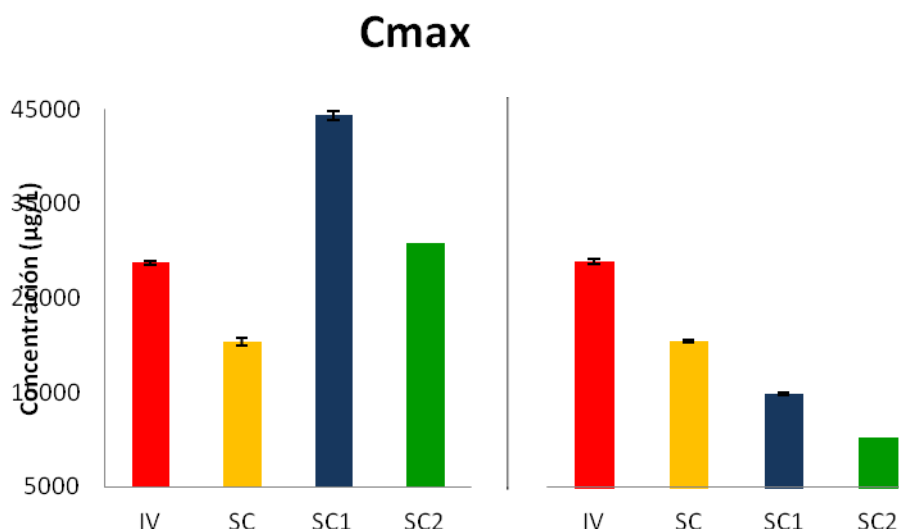


Figura 12.- Concentración máxima de danofloxacino en leche obtenida en la oveja tras la administración vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC) a una dosis de 6 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 18 mg/kg. *Valores de C_{máx} de danofloxacino en el gráfico de la derecha obtenidos para la leche, tras corregir las formulaciones SC1 y SC2 a una dosis de 6 mg/kg.

5.7.3.- ÁREA BAJO LA CURVA (AUC)

La prueba Kruskal-Wallis pone de manifiesto que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores de AUC obtenidos en los 4 casos. Sin embargo, aunque resulta menor el obtenido con la vía intravenosa y subcutánea respecto a la SC1 y SC2, debemos recordar, que en el caso de las formulaciones de liberación controlada, si se corrige el AUC a una dosis 3 veces menor (6 mg/kg), obtendríamos unos valores de 87554,79 y 94263,65 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$.

En la siguiente figura (Figura 13), se observa de forma gráfica las diferencias existentes en el área bajo la curva de concentración en leche-tiempo para danofloxacino, sin y con corrección de dosis, (A) y (B) respectivamente, en ovejas, entre la vía intravenosa y subcutánea con y sin polímero:

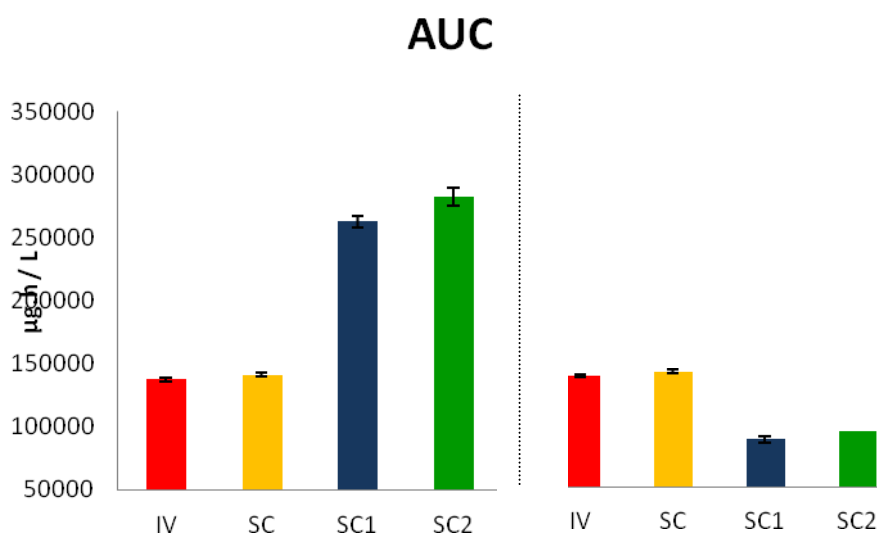


Figura 13.- Área bajo la curva de danofloxacino en leche obtenido en la oveja, tras la administración vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC) a una dosis de 6 mg/kg, y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (SC1) y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% (SC2) a una dosis de 18 mg/kg.

5.7.4.- RATIO AUC_{leche}/AUC_{plasma} , RATIO $C_{max\ leche}/C_{max\ plasma}$.

Ambos ratios muestran diferencias significativas cuando se compara una formulación con polímero con otra sin polímero, según el estudio comparativo no paramétrico de Kruskal-Wallis. Es el caso de las diferencias existentes entre SC1/IV, SC2/IV, SC1/SC y SC2/SC. Además, en la ratio $C_{max\ leche}/C_{max\ plasma}$, a diferencia de la ratio AUC_{leche}/AUC_{plasma} , hay diferencias significativas si se comparan las formulaciones no poliméricas (IV y SC).

A pesar de estas diferencias, las cifras obtenidas son sustancialmente superiores a las reportadas en otros estudios con fluoroquinolonas.

5.8.-INTEGRACIÓN FARMACOCINÉTICA/FARMACODINAMIA

Danofloxacino 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 se correlacionan con mayor frecuencia con el éxito clínico en el tratamiento de una infección y con la no aparición de mutantes resistentes son el ratio de concentración plasmática máxima $C_{m\acute{a}x}/CMI$ y el ratio área bajo la curva AUC/CMI (Xuan y cols., 2001).

Con modelos animales y diferentes quinolonas se ha observado que ratios $AUC/CMI \geq 100-125$ o de $C_{m\acute{a}x}/CMI \geq 8-10$ son buenos predictores de eficacia clínica (Craig y Dalhoff, 1998; Turnidge, 1999). Si bien, hay que señalar que estos valores numéricos de AUC/CMI y $C_{m\acute{a}x}/CMI$ se han generado 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 ovejas, o en general, a infecciones en animales (Lees y Shojaee Aliabadi, 2002a). Sin embargo, 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; Toutain y Lees, 2004).

Las experiencias realizadas con éstos modelos integrados farmacocinético-farmacodinámicos, han identificado la ratio AUC/CMI como el índice que mejor predice el éxito clínico, y la ratio $C_{m\acute{a}x}/CMI$ como el que mejor indica las dosis adecuada para evitar la aparición de resistencias (Andes y Craig, 2002b).

En el presente estudio se ha determinado la sensibilidad a danofloxacino frente a doce cepas de *Staphylococcus aureus* obtenidas de ovejas 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 danofloxacino, con un rango de concentraciones entre 0,250 mg/L – 0,0625 mg/L, siete presentaron CMI de 0,125 mg/L, una CMI de 0,25 mg/L y cuatro de 0,0625 mg/L (Tabla 43). Se establece, por tanto, como CMI_{90} , un valor de 0,125 mg/L para danofloxacino. Las cepas de referencia han presentado un

valor de CMI de 0,125 mg/L para *S. aureus* ATCC 29213 y 0,0312 mg/L para *E. coli* ATCC 25922.

Algunos autores han sugerido que valores de AUC/CMI, 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 ruminantes en experiencias *ex vivo*, han observado valores de AUC/CMI inferiores tal y como se muestra en la tabla siguiente:

AUC/CMI	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

Por tanto, en el presente estudio, para las cepas ovinas con CMI frente a danofloxacino de 0,125 mg/L, las ratios AUC/CMI, teniendo en cuenta una corrección de los datos a igualdad de dosis (6 mg/kg), son los siguientes:

	AUC24/CMI CMI = 0,125 mg/L	C_{máx} /CMI CMI = 0,125 mg/L
Formulación IV	83,72±13,34	Formulación IV 36,88±4,56
Formulación SC	85,1±10,19	Formulación SC 13,67±2,08
Formulación SC1	57,67±12,21	Formulación SC1 6,76±1,08
Formulación SC2	73,94±18,92	Formulación SC2 8,23±1,3

Sin embargo, se ha utilizado en las formulaciones SC1 y SC2 una dosis de 18 mg/kg. Cuando atendemos a los datos obtenidos en esta situación, al comparar las ratios AUC/CMI y C_{máx}/CMI podemos observar los siguientes resultados:

AUC₂₄/CMI CMI = 0,125 mg/L		C_{máx} /CMI CMI = 0,125 mg/L	
Formulación SC1	173,03±36,63	Formulación SC1	20,3±3,24
Formulación SC2	221,83±56,76	Formulación SC2	24,7±3,92

Las cifras de las ratios AUC/CMI predicen más claramente el éxito clínico del tratamiento, sobre todo con las dos formulaciones de liberación controlada. Con las C_{máx}/CMI podemos decir que la prevención de la aparición de mutantes resistentes está altamente asegurada. En esta situación, para las formulaciones SC1 y SC2, incluso para cepas con CMI de 0,25 mg/L obtendríamos unas ratios AUC/CMI > 80 y C_{máx}/CMI entre 8-36.

Estos últimos resultados nos indican que con las dos formulaciones de liberación controlada utilizadas en nuestro estudio obtendríamos un éxito clínico y evitaríamos la aparición de resistencias. Concretamente, con las formulaciones SC1 y SC2 se conseguirían unas concentraciones por encima de la CMI hasta aproximadamente las 18-20 horas posteriores a su administración para ambos casos. Sin embargo, con la formulación SC obtendríamos unas concentraciones superiores a la CMI de 0,125 µg/mL hasta las 10 h posteriores a su administración. Por tanto, la utilización de las formulaciones propuestas permite, *a priori*, disminuir sensiblemente el número de administraciones.

6-. CONCLUSIONES

1.- El comportamiento farmacocinético de danofloxacino tras su administración intravenosa (formulación IV) y subcutánea (formulación SC) en ovejas, a una dosis única de 6 mg/kg, y tras su administración subcutánea en solución del polímero P407 al 25% (formulación SC1) y en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% (formulación SC2), a una dosis de 18 mg/kg se ajusta, en todos los casos, a un modelo bicompartimental abierto. Las ecuaciones que representan sus concentraciones son las siguientes:

$$1) \text{ IV: } C = 4611,15 \cdot e^{-0,69 t} + 500,77 \cdot e^{-0,18 t} \quad \mu\text{g/L}$$

$$2) \text{ SC: } C = 33673,39 \cdot e^{-0,46 t} + 527,38 \cdot e^{-0,14 t} - 34200,77 \cdot e^{-1,36 t} \quad \mu\text{g/L}$$

$$3) \text{ SC1: } C = 46791,29 \cdot e^{-0,36 t} + 171,64 \cdot e^{-0,07 t} - 46962,93 \cdot e^{-0,45 t} \quad \mu\text{g/L}$$

$$4) \text{ SC2: } C = 65312,14 \cdot e^{-0,34 t} + 276,84 \cdot e^{-0,05 t} - 65534,65 \cdot e^{-0,39 t} \quad \mu\text{g/L}$$

2.- Las semividas en la fase terminal ($t_{1/2\lambda z}$) obtenidas para danofloxacino para las diferentes vías de administración y formulaciones son: IV (3,87 h), SC (5,18 h), SC1 (10,27 h) y SC2 (13,49 h), y son significativamente mayores en las formulaciones retardadas. Por otro lado, el MRT, adquiere, respectivamente, los siguientes valores: 2,85 h (IV), 5,23 h (SC), 5,45 h (SC1) y 7,13 h (SC2). La permanencia de danofloxacino es superior tras la administración subcutánea SC1 y SC2, por tanto, serían las mejores formas de administración a fin de obtener concentraciones plasmáticas durante un mayor tiempo.

3.- La depuración plasmática de danofloxacino en ovejas medida por el aclaramiento corporal (Cl) adquiere un valor de 0,62 L/kg·h, tras su administración intravenosa.

4.- El valor del volumen de distribución en el estado estacionario ($V_{ss} = 1,79$ L/kg) de danofloxacino tras la administración por vía intravenosa, indica 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 danofloxacino han sido: $1,36 \text{ h}^{-1}$ para la formulación SC, $0,45 \text{ h}^{-1}$ para SC1 y $0,39 \text{ h}^{-1}$ para la formulación SC2; siendo significativamente menores en las formulaciones retardadas, por lo que la absorción es significativamente más lenta. Estos resultados están en concordancia con el tiempo medio de absorción (MAT) que se incrementó desde 2,38 h, hasta 2,59 h y 4,28 h para las formulaciones SC, SC1 y SC2, respectivamente.

6.- Las concentraciones plasmáticas máximas ($C_{\text{máx}}$), obtenidas para danofloxacino en las formulaciones SC, SC1 y SC2 en ovejas, son estadísticamente diferentes entre ellas, adquiriendo valores desde 1709,57, 2537,42 y 3087,42 μL respectivamente. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la administración con las formulaciones retardadas (SC1 y SC2) se hizo a una dosis 3 veces superior a la formulación SC. Sin embargo, tan sólo existen diferencias estadísticamente significativas para el tiempo en que se alcanza dicha concentración máxima ($T_{\text{máx}}$) entre la administración SC (2,78 h) y la formulación SC2 (2,84 h), aunque la diferencia, como se aprecia es mínima. Por tanto, en los tres casos las concentraciones máximas se obtienen a tiempos muy parecidos.

7.- La biodisponibilidad (F) de danofloxacino, tras su administración SC en ovejas es del 104,6%. Valores inferiores de F resultan cuando se administra vía subcutánea en la formulación SC1 (69,52%) y en la SC2 (89,33%), existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los valores de F de la formulación SC1 y SC2.

8.- Con los resultados obtenidos, las fases de ingreso (condicionadas sobre todo por el tipo de formulación) pueden ser distintas (diferentes k_a y MAT), y parecen condicionar las fases de disposición (sobre todo la eliminación en la fase terminal) en función del tipo de formulación empleada.

9.- Los valores de los ratios $C_{\text{máx leche}}/C_{\text{máx plasma}}$ y $AUC_{\text{máx leche}}/AUC_{\text{máx plasma}}$, son muy superiores a uno en todos los casos para las vías extravasculares, e indican que el fármaco tiene un alto grado de acceso y acumulación desde el plasma hacia la leche. Por otro lado, los porcentajes de excreción van desde el 1,81%, de la dosis administrada

para la vía IV, hasta el 1,50 1,71 y 0,84 % de las dosis administradas para la vías SC, SC1 y SC2, respectivamente.

10.- Teniendo en cuenta el valor de MRT, se observa como la presencia del danofloxacino en leche es más prolongada cuando se administra en la formulación SC1 y SC2, pudiendo ser por tanto la formulación de elección a fin de obtener concentraciones del antibiótico en leche durante un mayor periodo de tiempo.

11.- Con los datos de CMI de danofloxacino, determinados *in vitro* frente a cepas específicas de *Staphylococcus aureus*, y teniendo en cuenta los índices $C_{m\acute{a}x}/CMI$ y AUC/CMI , se puede concluir que la administración una dosis de 6 mg/kg de danofloxacino por vía subcutánea con las tres formulaciones (SC, SC1 y SC2) podría ser efectiva contra aislados bacterianos con $CMI \leq 0,12 \mu\text{g/mL}$. Sin embargo, al haber utilizado en las formulaciones SC1 y SC2 una dosis de 18 mg/kg, los resultados presentados pueden predecir el éxito clínico y prevenir la aparición de resistencias frente aislados bacterianos con $CMI \leq 0,12 \text{ mg/L}$ e incluso con $CMI \leq 0,25 \text{ mg/L}$.

12.- La especialidad medicamentosa de partida, señala como régimen de dosificación una administración subcutánea (dosis 6 mg/kg) y repetir a las 48 horas. Según los resultados obtenidos, la administración SC mantiene las concentraciones plasmáticas por encima de la CMI 12 horas, la formulación SC1 mantiene esas concentraciones hasta las 24 horas y, la formulación SC2 hasta las 32 horas. Por tanto, la utilización de las formulaciones propuestas permitiría, *a priori*, disminuir sensiblemente el número de administraciones. Si hacemos una similitud con la posología recomendada, la formulación SC1 podría administrarse cada 48 horas y la SC2 cada 72 horas.

13.- El tratamiento de la mastitis ovina, mediante la administración de danofloxacino en solución con el polímero P407 al 25% (formulación SC1) y en solución con el polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% (formulación SC2), a una dosis de 18 mg/kg, alcanza niveles plasmáticos adecuados para que el fármaco alcance concentraciones eficaces contra *S.aureus*, al menos según los criterios farmacocinéticos-

farmacodinámicos empleados, las cepas estudiadas, y el tipo de ensayo, *in vitro*, realizado.

7-. CONCLUSIONS

1.- Pharmacokinetics of danofloxacin after a single intravenous (IV) and subcutaneous (SC) dose administration of 6 mg / kg, and after a 18 mg/kg subcutaneous administration of a 25% P407 polymer solution (SC1) and P407 polymer in solution of 25% with carboxymethylcellulose 2% (SC2) in sheep, was best described by an open two-compartment model in all cases. Equations of the model were:

$$1) \text{ IV: } C = 4611,15 \cdot e^{-0,69 t} + 500,77 \cdot e^{-0,18 t} \quad \mu\text{g/L}$$

$$2) \text{ SC: } C = 33673,39 \cdot e^{-0,46 t} + 527,38 \cdot e^{-0,14 t} - 34200,77 \cdot e^{-1,36 t} \quad \mu\text{g/L}$$

$$3) \text{ SC1: } C = 46791,29 \cdot e^{-0,36 t} + 171,64 \cdot e^{-0,07 t} - 46962,93 \cdot e^{-0,45 t} \quad \mu\text{g/L}$$

$$4) \text{ SC2: } C = 65312,14 \cdot e^{-0,34 t} + 276,84 \cdot e^{-0,05 t} - 65534,65 \cdot e^{-0,39 t} \quad \mu\text{g/L}$$

2.- Half-lives ($t_{1/2\lambda_z}$) of the terminal phase of the curve were: IV (3.87 h), SC (5.18 h), SC1 (10.27 h) and SC2 (13.49 h). Half-lives for the control-release formulations were significantly higher. Furthermore, MRT, values were: 2.85 h (IV), 5.23 h (SC), 5.45 h (SC1) and 7.13 h (SC2). Permanence of danofloxacin is higher after SC1 and SC2, therefore, SC1 and SC2 will get plasma concentrations for a longer time.

3.- After IV administration of danofloxacin, plasma clearance measured by body clearance (Cl) resulted in a value of 0.62 L/kg • h.

4.- The value of the volume of distribution at steady state ($V_{ss} = 1.79$ L/kg) for danofloxacin after IV administration indicates good distribution and easy access to tissues and fluids in this animal species.

5.- Absorption rate constants values obtained for danofloxacin were 1.36 h⁻¹ for the SC formulation, 0.45 h⁻¹ for SC1 and 0.39 h⁻¹ for SC2 formulation, showing significantly lower values in the long-acting formulations, with an absorption rate significantly slower. These results are consistent with the mean absorption time (MAT) that it was increased from 2.38 h to 2.59 h and 4.28 h for SC, SC1 and SC2 formulations, respectively.

6.- Maximum plasma concentrations (C_{\max}) obtained for danofloxacin after SC, SC1 and SC2 administrations in sheep, were statistically different from each other. The values reported for C_{\max} were 1709.57, 2537.42 and 3087.42 uL respectively. However, it is necessary to keep in mind that the long-acting formulations (SC1 and SC2) were performed at 3 times higher than for the SC formulation. But only significant differences were found between SC (2.78 h) and SC2 (2.84 h) for the necessary time to obtain this maximal concentration (T_{\max}), although the difference is minimal. Therefore, in all three cases the maximum concentrations are obtained at very similar times.

7.- The bioavailability (F) of danofloxacin, after SC administration in sheep was 104.6%. F values are lower SC1 (69.52%) formulation respect to the SC2 (89.33%) formulation, with significant differences between the F values for SC1 and SC2 formulation.

8.- With the obtained results, the income phases (mainly conditioned by the type of formulation) may be different (different K_a and MAT), and seem to determine the disposition phases (especially in the case of terminal elimination phase) depending on the control-release formulation used.

9.- $C_{\max \text{ leche}}/C_{\max \text{ plasma}}$ and $AUC_{\max \text{ leche}}/AUC_{\max \text{ plasma}}$ ratio values for extravascular routes are elevated in all cases, which indicates that the drug reaches high penetration and accumulation in milk. Furthermore, the excretion rates are 1.81% for the IV administration, 1.50, 1.71 and 0.84% for SC, SC1 and SC2 administrations respectively.

10.- Considering the value of MRT, the presence of danofloxacin in milk is longer when is administered by SC1 and SC2 formulations and might be the best formulation to obtain concentrations of danofloxacin in sheep milk for a longer time .

11.- According to the MIC values of danofloxacin determined in vitro against specific strains of *Staphylococcus aureus*, and C_{max}/MIC and AUC/MIC ratios, it can be concluded that subcutaneous administration of 6 mg/kg of danofloxacin with the three formulations (SC, SC1 and SC2) may be effective against isolates bacterial with $MIC \leq 0.12 \mu\text{g} / \text{mL}$. However, SC1 and SC2 formulations were done with a dosage of 18 mg / kg, and these results can predict clinical success and the prevention of bacterial resistance development against isolated bacterial with $MIC \leq 0.12 \text{ mg} / \text{L}$ and even with $MIC \leq 0.25 \text{ mg} / \text{L}$.

12.- The dosage regimen for the initial product indicates a subcutaneous administration (6 mg/kg) and repeat 48 hours later. According to the results, the SC administration maintains plasma levels above the MIC for 12 hours, SC2 formulation maintains those concentrations until 24 hours and SC2 until 32 hours. Therefore, the use of the proposed formulations allows, a priori, to reduce substantially number of administrations. If we make a similarity with the recommended dosage, the SC1 formulation may be administered every 48 hours and SC2 every 72 hours.

13.- Ovine mastitis treatment with danofloxacin 25% P407 polymer solution (formulation SC1) and 25% P407 polymer solution plus 2% carboxymethylcellulose (SC2 formulation) at a dose of 18 mg / kg, achieves adequate plasma levels in order to obtained effective concentrations against *S. aureus*, according to the pharmacokineticpharmacodynamic criteria used, the strains, and the type of in vitro test carried out.

8-. RESUMEN

El danofloxacino es una fluoroquinolona que fue desarrollada exclusivamente para uso veterinario. En su espectro antimicrobiano, ha mostrado ser efectivo frente a bacterias gram-negativas y algunas bacterias gram-positivas, micoplasmas, y patógenos intracelulares, tales como *Brucella* y especies de *Chlamydia*, pero tiene una actividad limitada contra organismos anaerobios (Ficha técnica AEMPS de Advocin solución inyectable®, 2008 y Advocin 180®, 2009). Estos microorganismos son responsables de infecciones intestinales, respiratorias y mamarias que causan importantes pérdidas económicas en el sector ganadero. Pero además, a danofloxacino se le atribuyen características farmacocinéticas como la rápida distribución y alta penetración en tejidos diana como es el caso de la glándula mamaria, pulmón o intestino (Escudero y cols., 2007 y Godinho y cols. 2007).

Se trata de una molécula mejorada con dos particularidades químicas que le confieren mejores propiedades, tales como: un átomo de flúor en posición 6 que mejora la unión a la DNA-girasa bacteriana y que hace que su penetración celular sea hasta 70 veces superior a las quinolonas que no poseen este flúor (Sumano, 1993), y un ciclo alifático diamino en posición 7 que le confiere mayor potencia, al contrario que les ocurre a las quinolonas que tienen en ésta posición moléculas lineales (McGuirk Pr, Jefson MR, 1992).

Por otra parte, son diversos los estudios que han descrito que danofloxacino tiene un alto paso de plasma a la leche (Shem-Tov y col., 1997, Escudero y cols., 2007), y aunque dicha indicación no está contemplada en su ficha técnica, este punto podría tener un papel importante en el tratamiento de enfermedades como la mastitis.

Por todo esto, se planteo el presente trabajo, en el que se ha llevado a cabo el estudio del comportamiento farmacocinético de danofloxacino en ovejas, con el objetivo de establecer los parámetros farmacocinéticos en esta especie animal, así como su penetración en leche.

El estudio se ha realizado sobre 5 ovejas todas ellas sanas y adultas y con pesos que oscilaban entre 72 y 106 Kg. Con una edad entre 2,5 y 3,5 años y de raza Lacaune; raza de origen francés caracterizadas por su alta producción lechera.

Las vías de administración y dosis han sido la vía intravenosa (IV) y subcutánea (SC) a la dosis de 6 mg/kg y la administración subcutánea a la dosis de 18 mg/kg en

solución del polímero P407 al 25% (SC1) y en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2% (SC2).

La administración intravenosa se realizó en un único bolo en la vena yugular y se obtuvieron muestras de la vena yugular contralateral inmediatamente antes de la dosificación (blanco) y a 0.083, 0.167, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48 y 72 h después de la dosis.

La administración subcutánea se realizó a nivel escapular y 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, 36, 48, 72, 96 y 120 h tras las tres administraciones subcutáneas.

Las muestras de leche fueron tomadas inmediatamente antes de la dosificación en el día de la administración del tratamiento y a las 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 32, 48, 72, 96 y 120 h después de la dosis en todos los casos.

La determinación de danofloxacino en plasma y leche se realizó mediante HPLC con detección fluorimétrica, siguiendo el método descrito por Siefert y cols. (1999). El ajuste a modelos farmacocinéticos compartimentales se realizó mediante los programas farmacocinéticos WinNonlin Professional® (Versión 5.2.1) y MULTIFIT® (Proost, 1997). El criterio utilizado para determinar cuál era la ecuación que mejor describía la evolución de los datos experimentales en cada caso, fue el Criterio de Información de Akaike (AIC) (Yamaoka y cols., 1978).

Para la determinación de los parámetros no compartimentales se utilizó el programa WinNonlin Professional® (Versión 5.2.1) y el tratamiento estadístico de los datos se ha realizado con el programa SPSS 19.0. Para comprobar la homogeneidad de los datos se ha realizado el test de Levene. Además se han realizado otros dos test estadísticos no paramétricos para comprobar si existen o no diferencias significativas en los parámetros farmacocinéticos obtenidos entre las diferentes vías de administración y los animales utilizados. El primero de ellos es la prueba de Kruskal-Wallis para conocer si los valores para cada parámetro farmacocinético presentaban diferencias significativas entre todas las vías de administración (IV, SC, SC1 y SC2) y las vías extravasculares (SC, SC1 y SC2). La segunda prueba utilizada es la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney, que se realiza cuando se detecta la existencia de diferencias estadísticamente significativas en alguna de las vías de administración, para

determinar entre qué vías se presentan las diferencias. Las diferencias consideradas estadísticamente significativas son aquellas cuya p obtenida es menor de 0,05.

Los resultados obtenidos tras la administración intravenosa, muestran que danofloxacino se distribuye según un modelo bicompartimental abierto, igual ocurre con la administración por vía subcutánea y en ambas formulaciones de liberación controlada.

Cuando se administró el danofloxacino vía intravenosa, vía subcutánea sin polímero, vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% y vía subcutánea en solución del polímero P407 al 25% más carboximetilcelulosa al 2%, se registraron los siguientes tiempos de vida media: $3,87 \pm 0,65$, $5,18 \pm 0,84$, $10,27 \pm 3,59$ y $13,49 \pm 2,90$ h, respectivamente. Los resultados estadísticos muestran que los valores de semivida son similares entre las formulaciones poliméricas cuando se comparan entre sí, pero diferentes al compararlas con formulaciones convencionales.

Los valores de MRT obtenidos han sido $2,86 \pm 0,25$, $5,23 \pm 0,62$, $5,45 \pm 0,77$ y $7,13 \pm 0,72$ h, respectivamente. Se observa como la permanencia del fármaco es mayor tras la administración extravascular y aun mayor en las dos formulaciones de liberación controlada.

Sin embargo, la biodisponibilidad de danofloxacino es menor cuando se administra dicho antibiótico con alguna de las formulaciones de liberación controlada respecto a la biodisponibilidad obtenida para la vía subcutánea convencional. Cuando se comparan entre sí las dos fórmulas poliméricas no existen diferencias significativas.

En el análisis farmacocinético de la leche se determinan parámetros que reflejan la penetración de danofloxacino a leche. Resulta obvio utilizar, para el tratamiento sistémico de la mastitis, antibióticos que alcancen en alto grado la glándula mamaria.

Por esto se determinaron parámetros como MRT, C_{\max} y los ratios $AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{plasma}}$ y $C_{\max\text{-leche}}/C_{\max\text{-plasma}}$.

Las cifras reportadas de MRT han sido $4,10 \pm 0,13$, $6,85 \pm 1,56$, $7,49 \pm 1,58$ y $8,29 \pm 0,89$ para la vía intravenosa, subcutánea, subcutánea con polímero P407 y subcutánea con polímero P407 más carboximetilcelulosa al 2% respectivamente, y se demuestra como las concentraciones alcanzadas en leche con las formulaciones

poliméricas subcutánea son más persistentes que cuando se administra el danofloxacino vía intravenosa o subcutánea simple.

Por otra parte, los valores de C_{\max} reportados en leche para las vías IV, SC, SC1 y SC2 han sido de 28734.02 ± 11069.35 , 20344.02 ± 4636.72 , 44370.58 ± 20548.37 y 30829.29 ± 8400.38 $\mu\text{g/L}$ respectivamente. Los valores de la ratio $\text{AUC}_{\text{leche}}/\text{AUC}_{\text{plasma}}$ han sido de 12.81 ± 3.62 , 13.53 ± 3.46 , 25.42 ± 9.25 y 27.12 ± 8.02 respectivamente para las distintas vías y la ratio $C_{\max\text{-leche}}/C_{\max\text{-plasma}}$ de 4.73 ± 1.81 , 12.04 ± 4.89 , 17.38 ± 6.55 y 18.11 ± 4.85 respectivamente.

A destacar la magnitud de dichos valores que ya se han registrado en otros estudios (Shem-Tov y cols., 1997, Escudero y cols., 2007).

Para explicar dicho fenómeno, en la literatura se barajan distintas hipótesis, pero la más apoyada por los diferentes autores, se basa en el transporte de danofloxacino a través de una proteína con alta expresión en tejido mamario llamada BCRP/ ABCG2 (Pulido y cols., 2006; Pérez M., y cols., 2012). Se trata de una proteína transportadora de eflujo tipo ATP-Binding Cassette (ABC) localizada en la membrana celular y que se relaciona con la movilización de fármacos, entre ellos las flouoroquinolonas, tal y como se ha demostrado en recientes estudios *in-vitro* (Merino y cols., 2006; Pulido y cols., 2006; Schrickx and Fink-Gremmels, 2008).

Para el estudio farmacocinético-farmacodinámicos (PK-PD) de danofloxacino se debe de tener en cuenta que las flouoroquinolonas pertenecen al grupo de antibacterianos con actividad concentración dependiente, es decir, producen la muerte bacteriana según la concentración alcanzada, en consecuencia los dos parámetros farmacocinético-farmacodinámicos que se correlacionan con mayor frecuencia con el éxito clínico son el ratio de concentración plasmática máxima C_{\max}/CMI (concentración mínima inhibitoria) y el ratio área bajo la curva AUC/CMI (Xuan y cols., 2001).

Por eso se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias de danofloxacino frente a cepas de *Staphylococcus aureus* a fin de determinar los índices farmacocinético-farmacodinámicos óptimos. Concretamente se ha determinado la sensibilidad a danofloxacino frente a doce cepas de *Staphylococcus aureus* obtenidas de ovejas 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 danofloxacino, con un rango de concentraciones entre 0,250 mg/L – 0,0625 mg/L, siete presentaron CMI de 0,125 mg/L, una CMI de 0,25 mg/L y cuatro de 0,0625 mg/L. Se establece, por tanto, como CMI₉₀, un valor de 0,125 mg/L para danofloxacino. Las cepas de referencia han presentado un valor de CMI de 0,125 mg/L para *S. aureus* ATCC 29213 y 0,0312 mg/L para *E. coli* ATCC 25922.

Por tanto, en el presente estudio, para las cepas ovinas con CMI frente a danofloxacino de 0,125 mg/L y teniendo en cuenta la dosis real administrada (6 mg/kg para IV y SC y 18 mg/kg para SC1 y SC2), las ratios AUC/CMI son los siguientes: 83,7±13,34 para IV, 85,1±10,19 para SC, 57,67±12,21 para SC1 y 73,94±18,92 para SC2, y los valores de las ratios C_{máx}/CMI fueron 36,88±4,56, 13,67±2,08, 6,76±1,08 y 8,23±1,3 respectivamente.

Las cifras de las ratios AUC/CMI predicen más claramente el éxito clínico del tratamiento, sobre todo con las dos formulaciones de liberación controlada. Con las C_{máx}/CMI podemos decir que la prevención de la aparición de mutantes resistentes está altamente asegurada.

De dicho estudio se puede concluir que una dosis de 18 mg/kg de danofloxacino con las formulaciones SC1 y SC2 obtendríamos el éxito clínico y evitaríamos la aparición de resistencias. Además se obtendrían concentraciones por encima de la CMI hasta aproximadamente las 18-20 horas posteriores a su administración para ambos casos. Sin embargo, con la formulación SC obtendríamos unas concentraciones superiores a la CMI de 0,125 µg/mL hasta las 10 h posteriores a su administración. Por tanto, la utilización de las formulaciones propuestas permite, *a priori*, disminuir sensiblemente el número de administraciones.

9-. SUMMARY

Danofloxacin is a fluoroquinolone that was developed exclusively for veterinary use. In its antimicrobial spectrum, it has been shown to be effective against gram-negative bacteria and some gram-positive, mycoplasma, and intracellular pathogens, such as *Brucella* and *Chlamydia* species, but it has limited activity against anaerobes bacteria (Technical details AEMPS Advocin solution for injection ®, 180 ® Advocin 2008 and 2009). These microorganisms are responsible for intestinal, respiratory and breast infections that cause significant economic losses in the livestock sector. But in addition, danofloxacin has ascribed to pharmacokinetic characteristics such as rapid distribution and high penetration in the target as is the case of the breast, lung, or bowel tissue (Squire et al., 2007 and Godinho et al. 2007).

It is an improved molecule with two chemical characteristics that confer improved properties, such as: a fluor atom at position 6 that enhances binding to bacterial DNA gyrase and that allows cellular penetration up to 70 times higher than quinolones without this fluor (Sumano, 1993). Furthermore, an aliphatic diamine in the 7 position cycle that results in higher power, unlike the quinolones that have linear molecules in this position (PrMcGuirk, Jefson MR 1992).

Moreover, several studies have described that danofloxacin has a high plasma to milk penetration (Shem-Tov et al., 1997, Escudero et al., 2007), and although such information is not mentioned in the technical information of danofloxacin, this point could play an important role in the treatment of diseases such as mastitis.

Therefore, the present work was posed and it was carried out to study the pharmacokinetic behaviour of danofloxacin in sheep, with the aim to establish the pharmacokinetic parameters in this animal species and their milk penetration.

The study has been carried on five healthy adult sheep of Lacaune breed with weights ranging from 72 to 106 kg and aged between 2.5 and 3.5 years. This breed of French origin is characterized by high production milk.

Administration routes and doses have been intravenous (IV) and subcutaneous (SC) doses of 6 mg / kg and subcutaneous administration at a dose of 18 mg / kg with the p407 polymer solution of 25% (SC1) and P407 polymer solution of 25% plus carboxymethylcellulose 2% (SC2).

Intravenous administration was carried out in a single bolus into the jugular vein and the samples were obtained from the contralateral jugular vein immediately before dosing (blank) and 0.083, 0.167, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48 and 72 h after dosing.

The subcutaneous administration was at scapular level and the blood samples were collected from the jugular vein before dosing (blank) and 0.083, 0.167, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48 and 72 h after the three subcutaneous administrations.

Milk samples were taken immediately before dosing on the day of treatment administration and at 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 32, 48, 72, 96 and 120 h after dose in each case.

Danofloxacin determination in plasma and in milk was done with HPLC with fluorimetric detection following the method described by Siefert et al. (1999). The compartmental pharmacokinetic adjustment modeling was done using WinNonlin® Professional (Version 5.2.1) and MULTIFIT® (Proost, 1997) pharmacokinetic programs. The criterion used to determine which was the equation that best described the evolution of the experimental data in each case was the Akaike Criterion Information (AIC) (Yamaoka et al., 1978).

For determination of non-compartmental parameters WinNonlin Professional software® (Version 5.2.1) was used and the statistical treatment of the data was done with SPSS 19.0 software. To verify the homogeneity of the data Levene's test was done. Two nonparametric statistical tests were also carried out to check whether there are significant differences in pharmacokinetic parameters between the different routes of administration and the animals used. The first is the Kruskal-Wallis test for to know if the values for each pharmacokinetic parameter showed significant differences among all routes of administration (IV, SC, SC1 and SC2) and extravascular routes (SC, SC1 and SC2). Mann-Whitney U is the second nonparametric test done when statistically significant differences are detected in some administration routes, in order to determine which routes the differences are presented. Statistically significant differences are those in which p is less than 0.05.

The results obtained after intravenous administration show that danofloxacin is distributed according to the open bicompartimental model, as were the subcutaneous administration and both controlled release formulations.

When danofloxacin was administered intravenously, subcutaneously without polymer, subcutaneously with 25% P407 polymer solution and subcutaneously with 25% P407 polymer solution and 2% carboxymethylcellulose, the following half-life times were recorded: 3.87 ± 0.65 , 5.18 ± 0.84 , 10.27 ± 3.59 and 13.49 ± 2.90 h, respectively. Statistical results show that the half-life values are similar among the polymer formulations when they are compared with each other, but they are different as compared with conventional formulations.

MRT values obtained were 2.86 ± 0.25 , 5.23 ± 0.62 , 5.45 ± 0.77 and 7.13 ± 0.72 h, respectively. It was observed that the permanence of the drug is higher following extravascular administration and even higher in the two controlled release formulations.

However, the bioavailability of danofloxacin is lower when said antibiotic is administered with one of the controlled release formulation relative to the bioavailability obtained for conventional subcutaneous administration. When compared to each other, the two polymeric formulas there are not significantly different.

In the milk pharmacokinetics analysis, parameters were determined that reflected the penetration of danofloxacin to milk. It is obvious that antibiotics are used for the systemic treatment of mastitis achieve a high concentration in the mammary gland.

Therefore parameters such as MRT, C_{\max} and $AUC_{\text{milk}} / AUC_{\text{plasma}}$ ratios and $C_{\max\text{-milk}}/C_{\max\text{-plasma}}$ was determined.

The reported numbers of MRT were 4.10 ± 0.13 , 6.85 ± 1.56 , 7.49 ± 1.58 and 8.29 ± 0.89 for intravenous route, subcutaneous without polymer, subcutaneously with 25% P407 polymer solution and subcutaneous with 25% P407 polymer solution and 2% carboxymethylcellulose respectively. This demonstrates how the concentrations achieved in the milk with subcutaneous polymer formulations are more persistent than when danofloxacin is administered intravenously or subcutaneously without polymer.

Moreover, C_{max} values reported in milk for IV, SC, SC1 and SC2 routes were 28734.02 ± 11069.35 , 20344.02 ± 4636.72 , 44370.58 ± 20548.37 and 30829.29 ± 8400.38 mg/L respectively. $AUC_{milk} / AUC_{plasma}$ ratio values were 12.81 ± 3.62 , 13.53 ± 3.46 , 25.42 ± 9.25 and 27.12 ± 8.02 respectively for the different routes and the $C_{max}^{milk} / C_{max}^{plasma}$ ratio were 4.73 ± 1.81 , 12.04 ± 4.89 , 17.38 ± 6.55 and 18.11 ± 4.85 respectively.

The magnitude of the values which have already been recorded in other studies (Shem-Tov et al., 1997, Escudero et al., 2007).

To explain this phenomenon, different hypotheses are being considered in the literature. However the most supported by different authors is based on the danofloxacin transport through a protein with high expression in breast tissue called BCRP / ABCG2 (Pulido et al., 2006, Perez M., et al, 2012). It is a transport protein efflux type ATP-Binding Cassette (ABC) located in the cell membrane and which is concerned with the movement of drugs, including fluoroquinolones, as it has been shown in recent in vitro studies (Merino et al, 2006; Pulido et al, 2006; Schrickx Gremmels and Fink, 2008).

For pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) study of danofloxacin, it should be noted that the fluoroquinolones belong to the antibacterial group with concentration dependent activity, that is, the bacterial death is produced according to the concentration obtained. Consequently, the two pharmacokinetic-pharmacodynamic parameters that correlate more frequently with clinical success are the ratio of maximum plasma concentration C_{max} / MIC (minimum inhibitory concentration) and the ratio of area under the curve AUC / MIC (Xuan et al., 2001).

For this reason, the minimum inhibitory concentrations of danofloxacin against *Staphylococcus aureus* strains were determined in order to obtain the pharmacokinetic-pharmacodynamic optimal ratios. Specifically, danofloxacin sensitivity has been determined in twelve *Staphylococcus aureus* strains from lactating-sheep with chronic staphylococcal intramammary disease on commercial farms.

Staphylococcus aureus ATCC 29213 and *Escherichia coli* ATCC 25922 were used as reference strains

The strains were studied against danofloxacin, with a concentration range of 0.250 mg /L - 0.0625 mg/L. Seven strains had MIC of 0.125 mg / L, one 0.25 mg / L

and four 0.0625 mg / L. It was established, as MIC 90, 0.125 mg / L to danofloxacin. Reference strains reported a MIC value of 0.125 mg / L for *S. aureus* ATCC 29213 and 0.0312 mg / L for *E. coli* ATCC 25922.

In this study, for the ovine strains with 0.125 mg / L MIC of danofloxacin and taking into account the actual dose administered (6 mg/kg for IV and SC and 18 mg / kg to SC1 and SC2), the ratios AUC / MIC were: 83.7 ± 13.34 for IV, 85.1 ± 10.19 for SC, 57.67 ± 12.21 for SC1 and 73.94 ± 18.92 for SC2, and values of C_{\max} / MIC ratios were 36.88 ± 4.56 , 13.67 ± 2.08 , 6.76 ± 1.08 and 8.23 ± 1.3 respectively.

The figures of the AUC/MIC ratios predict more clearly the clinical success of treatment, especially with the two long-acting formulations. With the C_{\max} / MIC we can say that the preventing of emergent resistant mutants is highly secure.

From this study can be concluded that a dose of 18 mg / kg of danofloxacin with SC1 and SC2 formulations we would obtain clinical success and we would avoid the emergent resistances. Also we would obtain concentrations above the MIC until approximately 18-20 hours after administration for both cases. However, with the SC formulation would get a higher MIC of 0.125 mg / mL concentrations until 10 h after administration. Therefore, the use of the proposed formulations can, a priori, to reduce appreciably the number of administrations.

10-. BIBLIOGRAFÍA

- ABD EL-ATY, A.M., Y GOUDAH, A., 2002. Some pharmacokinetic parameters of pefloxacin in lactating goats. *Veterinary Research Communications* 26, 553-61.
- ÁLAMO FERNÁNDEZ LUISA. Estudio farmacocinético de marbofloxacino en conejos. 2012. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- 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):1979-89.
- 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.
- ALIABADI, F.S., LANDONI M. F., LEES P. 2003a. Pharmacokinetics (PK), Pharmacodynamics (PD), and PK-PD Integration of Danofloxacin in Sheep Biological Fluids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p. 626–635.
- ALIABADI, F.S., LANDONI M. F., LEES P. 2003b. Pharmacokinetics and PK-PD modelling of danofloxacin in camel serum and tissue cage fluids. *The Veterinary Journal* 2003, 165, 104–118
- ALIABADI, F.S., LEES, P., 2003c. Pharmacokinetic-pharmacodynamic integration of danofloxacin in the calf. *Res Vet Sci.*;74(3):247-59.
- ALOS, J. I., 2003. Quinolones. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* 21:261-267.
- ALLON, M., LOPEZ, E.J., MIN, K.W., 1990. Acute renal failure due to ciprofloxacin. *Arch Intern Med*; 150:2187-9.
- AMINIMANIZANI, A., BERINGER, P., JELLIFFE, R., 2001. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of the newer fluorquinolone antibacterials. *Clinical Pharmacokinetics* 40, 169-187.
- ANDERSSON, M. I. Y MACGOWAN, A.P., 2003. Development of the quinolones. *J.Antimicrob.Chemother.* 51:1-11.
- 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., 1995. Quinolone activity against anaerobes: microbiological aspects. *Drugs*;49(Suppl. 2):76–80.
- APPELBAUM, P.C., HUNTER, P.A., 2000. The fluorquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents* 16, 5-15.
- APPELBAUM, P. C., PANKUCH, G.A., BOZDOGAN, B., LIN, G., JACOBS, M.R., PATEL, M.V., GUPTE, S.V., JAFRI, M.A., DE SOUZA, N.J. Y KHORAKIWALA, H.F., 2005. Activity of the new quinolone WCK 771 against pneumococci. *Clin.Microbiol.Infect.* 11:9-14.
- 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.
- ATABAY, H .I., AYDIN, F., 2001. Susceptibility of *Arcobacter butzleri* isolates to 23 antimicrobial agents. *Letters in Applied Microbiology*, 33 : 430 - 433.
- ATEF, M., EL-GHENDI, A.I., AZIZA, AMER, M.M, ABD EL-ATY, A.M., 2001. Some pharmacokintetic data for danofloxacin in healthy goats. *Veterinary Research Comunciations*, 25: 367 - 377.
- ATKINSON, A.J.Jr. & KUSHNER, W., 1979: Clinical Pharmacokinetics. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 19: 105-127.
- 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. *Journal of Antimicrobial Chemoterapy* 46 (Suppl T1), 17-24.
- BARRY, A.L., FUCHS, P.C., BROWN, S.D., 2001. In vitro activities of three nonfluorinated quinolones against representatives bacterial isolates. *Antimicrob Agents Chemother*; 45: 1923-1927

- BAUER, T. M., FOLLO, A., NAVASA, M., VILA, J., PLANAS, R., CLEMENTE, G., VARGAS, V., BORY, F., VAQUER, P. Y RODES, J., 2002. Daily norfloxacin is more effective than weekly rufloxacin in prevention of spontaneous bacterial peritonitis recurrence. *Dig.Dis.Sci.* 47:1356-1361.
- BAUERNFEIND, A., 1997. Comparison of the antibacterial activities of the quinolones Bay 12-8039, gatifloxacin (AM 1155), trovafloxacin, clinafloxacin, levofloxacin and ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother*; 40:639–51.
- BEBEAR, C.M., RENAUDIN, H., CHARRON, A., CLERC, M., PEREYRE, S., BEBEAR, C., 2003. DNA gyrase and topoisomerase IV mutations in clinical isolates of *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma hominis* resistant to fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47, 3323–3325.
- BERGOGNE-BEREZIN, E., 2002. Clinical role of protein binding of quinolones. *Clinical Pharmacokinetics* 41, 741–750.
- BERMINGHAM, EC., AND PAPICH, MG., 2002. Pharmacokinetics after intravenous and oral administration of enrofloxacin in sheep. *American Journal of Veterinary Research.*; 63 (7): 1012-1017.
- BERTINO, J.R., FISH, D., 2000. The safety profile of the fluorquinolones. *Clinical Pharmacokinetics* 41, 741-750.
- BLONDEAU, J.M., 2004. Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. *Surv.Ophthalmol.* 49 Suppl 2:S73-S78.
- BOUTHIER, D.L.T., PORTEMER, C., HUBER, R., FORTERRE, P. Y DUGUET, M., 1991. Reverse gyrase in thermophilic eubacteria. *J.Bacteriol.* 173:3921-3923.
- BREGANTE, M.A., DE JONG, A., ARAMAYONA, J.J., GARCÍA, M.A., SOLANS, C. AND RUEDA, S. (2000) Protein binding of fluoroquinolones applied to livestock and companion animals. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 23, (suppl. 1)B16.
- BRIGHTY, K.E, GOOTZ, T.D., 1997. The chemistry and biological profile of trovafloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 39 (Suppl. B): 1-14.
- BRISSE, S., MILATOVIC, D., FLUIT, A.C. Y COLS., 1999. Comparative in vitro activities of ciprofloxacin, clinafloxacin, gatifloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, and trovafloxacin against *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*,

- and *Enterobacter aerogenes* clinical isolates with alterations in GyrA and ParC proteins. *Antimicrob Agents Chemother*;43:2051–5.
- BROWN, S.A., 1996. Fluorquinolones in animal health. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*; 19 1-14.
- BRYSKIER A., CHANTOT J F. 1995, Classification and structure- activity relationships of fluoroquinolones. *Drugs*. 49 (Suppl 2):16-28.
- BURGMANN, P., 2000. Antimicrobial Drug Use in Rodents, Rabbits, and Ferrets. En: *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 3^a ed. Ed: Prescott JF, Baggot JD y Walker RD, Blackwell Scientific Publications. Iowa. Pág: 674-675.
- BUTTS, J.D., 1994. Intracellular concentrations of antibacterial agents and related clinical implications. *Clinical Pharmacokinetics* 27, 63–84.
- Cabanes, A., Reig,F., Antón, J.M., Arboix, M.,1995. Sustained release of liposome-encapsulated enrofloxacin after intramuscular administration in rabbits.*Am J Vet Res.*;56(11):1498-501.
- CAPRONI JR L., UMEHARA, O., COSTA, E.O., BENITES, N.R., MELVILLE, P.A., RAEMDONCK, D., 2002. Clinical efficacy of danofloxacin 18% in the treatment of naturally occurring infectious diseases in cattle.*Arq. Inst. Biol.*; 69, (4),7-13.
- CÁRCELES, C.M., SERRANO, J.M., 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 A Physiol Pathol Clin Med.*;53(6):300-4.
- CARCELES, C.M., ESCUDERO, E., FERNANDEZ-VARON, E. AND MARIN, P., 2009. Pharmacokinetics after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration of moxifloxacin in sheep. *Veterinary Journal*, 180, (3)343-347.
- 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.
- CECCHETTI, V., FRAVOLINI, A., LORENZINI, M.C., TABARRINI, O., TERNI, P., XIN, T., 1996. Studies on 6-aminoquinolones: Synthesis and antibacterial evaluation of 6-amino-8-methylquinolones. *J Med Chem*; 39: 436-445.

- 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.
- ÇETIN, C., SENTÜRK, S., KOCABIYIK, A.L., TEMİZEL, M.,ÖZEL,E., 2003. Bacteriological Examination of Urine Samples from Dogs with Symptoms of Urinary Tract Infection. *Turk J Vet Anim Sci*; 27: 1225-1229.
- CHARLESTON, B., GATE, J.J., AITKEN, I.A., STEPHAN, B., FROYMAN, R., 1998. Comparison of the efficacies of three fluoroquinolone antimicrobial agents, given as continuous or pulsed-water medication, against *Escherichia coli* infection in chickens. *Antimicrob Agents Chemother.* ;42(1):83-7.
- CHEN, C.R., MALIK, M., SNYDER, M., DRLICA, K., 1996. DNA gyrase and topoisomerase IV on the bacterial chromosome: Quinolone-induced DNA cleavage. *J Mol Biol*; 258: 627-637.
- CHIN, N.X., NEU, H.C., 1987. Postantibiotic suppressive effect of ciprofloxacin against Gram positive and Gram negative bacteria. *Am. J. Med.* 82 (Suppl. 4A): 58-62.
- CHRIST, W., 1990. Central nervous system toxicity of quinolones: human and animal findings. *J Antimicrob Chemother*; 26(Suppl B): 219-25.
- CHU, D.T. Y FERNANDES, P.B., 1989. Structure-activity relationships of the fluoroquinolones. *Antimicrob.Agents Chemother.* 33:131-135.
- CIFTCI, A., FINDIK, A., IÇA, T., BAS, B., ONUK, E.E., GÜNGÖRDÜ, S.,2009. Slime production and antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* isolated from arthritis in chickens. *J Vet Med Sci.* ;71(6):849-53.
- CRAIG, W.A., GUDMUNDSSON, S., 1991. The postantibiotic effect. pp: 403-431. En Lorian 1'. (ed.). *Antibiotics in laboratory medicine.* 3th Ed., Williams and Wilkins, Baltimore.
- 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.
- COHEN, S.P., MCMURRY, L.M., LEVY, S.B., 1988. *marA* locus causes decreased expression of *OmpF* porin in multiple-antibiotic resistant (Mar) mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*; 170: 5416-5422.

- 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.
- COOPER, A.C., FULLER, J.R., FULLER, M.K., WHITTLESTONE, P., WISE, D.R., 1993. In vitro activity of danofloxacin, tylosin and oxytetracycline against mycoplasmas of veterinary importance. *Res Vet Sci.* ;54(3):329-34.
- COORAY, H.C., JANVILISRI, T., VAN VEEN, H.W., HLADKY, S.B. & BARRAND, M.A. 2004, Interaction of the breast cancer resistance protein with plant polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 271, 269–275.
- CORDIÉS JACKSON L. et al 1998. *Acta médica; Quinolonas y terapia antimicrobiana* 1998;8(1):58-65
- CORMICAN, M.G., JONES, RN., 1997. Antimicrobial activity and spectrum of LB20304, a novel fluoronaphthyridone. *Antimicrob Agents Chemother*;41:204–11.
- COSTERTON, J.W., STEWART, P.S., GREENBERG, E.P., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318–1322
- 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.
- CULLEN, M.E., WYKE, A.W., KURODA, R. Y FISHER, L.M., 1989. Cloning and characterization of a DNA gyrase A gene from *Escherichia coli* that confers clinical resistance to 4-quinolones. *Antimicrob.Agents Chemother.* 33:886-894.
- CURTIS, L.H., OSTBYE, T., SENDERSKY, V., HUTCHISON, S., ALLEN LAPOINTE, N.M., AL KHATIB, S.M., USDIN, Y.S., DANS, P.E., WRIGHT, A., CALIFF, R.M., WOOSLEY, R.L., SCHULMAN, K.A., 2003. Prescription of QT-prolonging drugs in a cohort of about 5 million outpatients. *American Journal of Medicine* 114, 135–141.
- 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.

- DALHOFF, A., ULLMANN, U., 1990. Correlation between pharmacokinetics, pharmacodynamics and efficacy of antibacterial agents in animal models. *Eur. J. Clin. Microbiol. infect. Dis.*, 9: 79-487.
- DÁMASO, D., 1990. *Antibacterianos*. Ed. Marketing Pharm, S.A. Madrid. Pág: 13-17 y 533-584.
- DAUTREY, S., FELICE, K., PETIET, A., LACOUR, B., CARBON, C., FARINOTTI, R., 1999. Active intestinal elimination of ciprofloxacin in rats: modulation by different substrates. *British Journal of Pharmacology* 127, 1728–1734.
- DAVIDSON, R., CAVALCANTI, R., BRUNTON, J.L., BAST, D.J., DE AZAVEDO, J.C., KIBSEY, P., FLEMING, P.C. Y LOW, D.C., 2002. Resistance to levofloxacin and failure of treatment of pneumococcal pneumonia. *N.Engl.J.Med.* 346:747-750.
- DAVIS, R., MARKHAM, A., BALFOUR, J.A., 1996. Ciprofloxacin: na updated review of its pharmacology, therapeutic efficacy and tolerability. *Durgs*; 51: 1019-74.
- DAVIES, T.A., HOELLMAN, D., JACOBS, M.R., APPELBAUM, P.C., 1999. Activity of gemifloxacin (SB-265805) compared with other quinolones against quinolone-resistant *Haemophilus influenzae*. In: *Proceedings of 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, San Francisco, CA, Poster 1499.
- DEGUCHI, T., YASUDA, M., KAWAMURA, T. Y COLS. 1997. Improved antimicrobial activity of DU-6859a, a new fluoroquinolone, against quinolone-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* isolates with alterations in GyrA and ParC proteins. *Antimicrob Agents Chemother*;41:2544–6.
- DEFORGES, L., FOURNET, M.P., SOUSSY, C.J., DUVAL, J., 1986. Antibacterial activity in vitro of 10 quinolones against 20 strains of *Legionella pneumophila*. *Pathol Biol (Paris)*;34:631–3.
- DEZIEL, M.R., LOUIS, A., HEINE, H., BUSH, K., KAO, M., KELLEY, M., DRUSANO, G.L., 2001. Evaluation of levofloxacin in a hollow fiber infection model against *Bacillus anthracis* utilizing both human and Rhesus Monkey pharmacokinetic profiles. Abstracts of the 41st Annual Meeting of the Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Abstract # A-1157, Chicago, IL.
- 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., PLÁ DELFINA, J.M., 1997. Biofarmacia y Farmacocinética. Ed. Síntesis S.A., Madrid. Volumen 1. Páginas: 35, 94-115, 278 392-420.
- 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., 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV and the 4-quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61, 377-92.
- DRLICA, K., 1999. Mechanism of fluoroquinolone action. *Curr.Opin.Microbiol.* 2:504-508.
- 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.
- DUBOIS, J., ST-PIERRE, C., 1999. In vitro activity of gatifloxacin, compared with ciprofloxacin, clarithromycin, erythromycin, and rifampin against *Legionella spp.* *Diagn Microbiol Infect Dis*;33:261–5.
- EDNIE, L.M., JACOBS, M.R., APPELBAUM, P.C., 1997. Comparative activities of clinafloxacin against gram-positive and -negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*;42:1269–73.
- EDNIE, L.M., JACOBS, M.R., APPELBAUM, P.C., 1998. Activities of gatifloxacin compared to those of seven other agents against anaerobic organisms. *Antimicrob Agents Chemother*;42:2459–62. *American Journal of Veterinary Research*, 63 (7): 1012-1017.
- EMMERSON, A.M. & JONES, A.M., 2003. The quinolones: decades of development and use. *J. Antimicrob. Chemother.* 51(S1): 13–20.
- ESCUDERO, E., ESPUNY, A., VICENTE, S., CÁRCELES, CM., 1999. Pharmacokinetics of an ampicillim-sulfactam combination after intravenous and intramuscular administration to sheep. *Canadian Journal of Veterinary Research* 63 (1), 25-30.
- 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.
- ESPOSITO, S., GALANTE, D., BARBA, D., GIUSTI, R., BIANCHI, W., GAGLIARDI, R., 1988. Efficacy and safety of ciprofloxacin in the treatment of UTIs and RTIs in patients affected by liver diseases. *Infection*, 16 (suppl. 1): 57-61.

- EVERETT, M.J., JIN, Y.F., RICCI, V., PIDDOCK, L.J., 1996. Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40, 2380–2386.
- FELMINGHAM, D., O'HARE, M.D., ROBBINS, M.J. Y COLS., 1985. Comparative in vitro studies with 4-quinolone antimicrobials. *Drugs Exp Clin Res*;11:317–29.
- FELMINGHAM, D., ROBBINS, M.J., LEAKEY, A. Y COLS., 1999. In vitro activity of moxifloxacin (BAY 12-8039), a novel 8-methoxyquinolone, compared with ofloxacin and other antibiotics. In: Adam D, Finch R, Hunter P, editors. *Moxifloxacin in Practice*, vol. 2. Oxford: Maxim Medical,:27–37.
- FERRNÁNDEZ-MOSTEIRÍN N., SALVADOR-OSUNA C., GIMENO LOZANO J., MARCO LAMATA M.L. 2005 Incidencia de episodios febriles en pacientes con mieloma múltiple sometidos a trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica (TASPE) *An. Med. Interna (Madrid)* v.22 n.5 Mayo 2005.
- FERRNÁNDEZ PALACIOS O'CONNOR, R. 2013. Estudio farmacocinético de formulaciones poliméricas de liberación sostenida para marbofloxacino en la cabra. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- FERNÁNDEZ-VARÓN, E., AYALA, I., MARÍN, P., CARRIÓN, A., MARTOS, N., ESCUDERO, E., CÁRCELES, CM., 2006a. 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., 2006b. 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., 2007. Pharmacokinetics-pharmacodynamic integration of danofloxacin after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration to rabbits. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 30, 18-24.
- FISH, D.N., 2001. Fluoroquinolone adverse effects and drug interactions. *Pharmacotherapy*, 21(10 Pt 2): 253S-272S.
- FITTON, A. (1992) The Quinolones. An Overview of their Pharmacology. *Clinical Pharmacokinetics*, 2, ((suppl1)1-11.

- 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.
- FORREST, A., CHODOSH, S., AMANTEA, M.A., COLLINS, D.A., SCHENTAG, J.J., 1997. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral grepafloxacin in patients with acute bacterial exacerbations of chronic bronchitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 40 (Suppl A), 45–57.
- FRIIS C., 1993. Penetration of danofloxacin into the respiratory tract tissues and secretions in calves. *Am J Vet Res.*;54(7):1122-7.
- 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.
- FUNG-TOMC, J., GRADELSKI, E., BONNER, D., 1999. Killing rates of streptococci and related organisms by fluoroquinolones. In: *Proceedings of 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, San Francisco, CA,: Poster 2329.
- 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).
- GARGALLO-VIOLA, D., ESTEVE, M., LLOVERA, S. Y 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.
- GELLERT, M., MIZUUCHI, K., O'DEA, M.H. Y NASH, H.A., 1976. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 73:3872-3876.
- GEORNARAS, I., HASTINGS, J.W., VON HOLY, A., 2001. Genotypic Analysis of *Escherichia coli* Strains from Poultry Carcasses and Their Susceptibilities to Antimicrobial Agents. *Appl Environ Microbiol.* ; 67(4): 1940–1944.
- GEORNARAS, I., VON HOLY, A., 2001. Antimicrobial susceptibilities of isolates of *Staphylococcus aureus*, *Listeria* species and *Salmonella* serotypes associated with poultry processing. *Int J Food Microbiol.* ;70(1-2):29-35.
- GHARAI BEH, S., AL RIFAI, R., AL-MAJALI, A., 2010. Molecular typing and antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from broiler chickens. *Anaerobe.*;16(6):586-9. Epub 2010 Oct 20.

- GIBALDI, M. & PERRIER, P., 1982. Pharmacokinetics 2nd ed. Marcel Dekker. New York.
- GILES, C.J., GRIMSHAW, W.T., SHANKS, D.J., SMITH, D.G., 1991. Efficacy of danofloxacin in the therapy of acute bacterial pneumonia in housed beef cattle. *Veterinary Record*;128:296-300 doi:10.1136/vr.128.13.296.
- GIRAUD, E., CLOECKAERT, A., KERBOEUF, D. & CHASLUS-DANCLA, E., 2000. Evidence for active efflux as the primary mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 1223–1228.
- 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., 1988. Fluorquinolonas: estructura, actividad in vitro, mecanismo de acción y resistencia. *Medicine.*, pág. 33-40.
- GOBERNADO, M. & SANTOS, M., 2002. Quinolonas En: Tratamiento antimicrobiano. 3^o ed. Ed: Drobnic L.Ergon. Madrid. Pág: 323- 348.
- GOLDSTEIN, E.J.C., CITRON, D.M., WARREN, Y., TYRRELL, K., MERRIAM, C.V., 1999. In vitro activity of gemifloxacin (SB 265805) against anaerobes. *Antimicrob Agents Chemother*;43:2231–5
- GONZALEZ F., RODRIGUEZ C., NIETO J., DE VICENTE M.L., SAN ANDRÉS M.D., 1997. Age-related differences in norfloxacin pharmacokinetic behaviour following intravenous and oral administration in sheeps. *Vet Quart* 19: 145-50
- GONZÁLEZ, F., SAN ANDRÉS, M.I., NIETO, J., SAN ANDRÉS, M.D., WAXMAN, S., VICENTE, M.L., LUCAS, J.J. AND RODRÍGUEZ, C. 2001. Influence of ruminal distribution on norfloxacin pharmacokinetics in adult sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 24, (4)241-245.
- 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.
- GOUDAH, A., MOUNEIR, S.M., 2009. Disposition kinetics and tissue residues of danofloxacin in Muscovy ducks. *Br Poult Sci.*;50(5):613-9.

- 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.
- GRIFFITHS, N.M., HIRST, B.H., SIMMONS, N.L., 1994. Active intestinal secretion of the fluoroquinolone antibacterials ciprofloxacin, norfloxacin and pefloxacin; a common secretory pathway? *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 269, 496–502.
- GRIMSHAW, W.T., GILES, C.J., COOPER, A.C., SHANKS, D.J., 1990. The efficacy of danofloxacin in the therapy of pneumonia associated with *Pasteurella* species in housed calves. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* ;97(12):529-32.
- 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.
- GUTIÉRREZ-ZUFIAURRE, N., 2004. Relación entre estructura, actividad y efectos adversos de las quinolonas. *Rev Esp Quimioterpa*. Septiembre. Vol. 17 (Nº 3): 232-243.
- GUTHRIE, R.M., JACOBS, M., LOW, D.E., MANDELL, L., SLAMA, T., 2004. Treating resistant respiratory infections in the primary care setting: the role of the new quinolones. University of Cincinnati College of Medicine Continuing Medical Education.
- HANNAN, P.C., WINDSOR, G.D., DE JONG, A., SCHMEER, N., STEGEMANN, M., 1997. Comparative susceptibilities of various animal-pathogenic mycoplasmas to fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother.*;41(9):2037-40.
- HARITOVA, A.M., RUSENOVA, N.V., PARVANOV, P.R., LASHEV, L.D., FINK-GREMMELS, J., 2006. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of danofloxacin in turkeys. *Vet Res Commun.*;30(7):775-89.
- HAYEM, G., CARBON, C., 1995. A reappraisal of quinolone tolerability: the experience of their musculoskeletal adverse effects. *Drug Saf*; 13: 338-42.
- HEDDLE, J.G., BARNARD, F.M., WENTZELL, L.M. Y MAXWELL, A., 2000. The interaction of drugs with DNA gyrase: a model for the molecular basis of quinolone action. *Nucleos. Nucleot. Nucleic Acids* 19:1249-1264.
- HEESSEN, F.W., MUYTJENS, H.L., 1984. In vitro activities of ciprofloxacin, norfloxacin, pipemidic acid, cinoxacin, and nalidixic acid against *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrob Agents Chemother*;25:123–4.

- HEISIG, P., 1996. Genetic evidence for a role of parC mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*; 40: 879-855.
- HOELLMAN, D.B., LIN, G., JACOBS, M.R., APPELBAUM, P.C., 1999. Anti-pneumococcal activity of gatifloxacin compared with other quinolone and non-quinolone agents. *J Antimicrob Chemother*; 43:645-9.
- HOOPER DC, WOLFSON JS.1987. Mechanismo of action and resistance to ciprofloxacin. *Am J Med*;82(Suppl 4 A):12-20.
- HIGGINS, P.G., FLUIT, A.C. Y SCHMITZ, F.J., 2003. Fluoroquinolones: Structure and target sites. *Current Drug Targets* 4:181-190.
- HOLCK T., PEREZ MARTINEZ J., RAEMDONCK D., 1993. In-vitro evaluation of danofloxacin and 11 other antimicrobials against enterotoxigenic *E.coli* and *Salmonella spp* of bovine origin. Pfizer Inc. North American Animal Health Division. Lee Summit, MO, 64081, USA.
- HOOPER, D.C., 2000. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin.Infect.Dis.* 31:S24-S28.
- 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, K.H., HOVDE, L.B., ROSS, G., GUNDERSON, B., WRIGHT, D.H., ROTSCHAFFER, J.C., 2002. Microbiologic effectiveness of time- or concentration-based dosing strategies in *Streptococcus pneumoniae*. *Diagnostic Microbiology Infectious Diseases* 44, 265-271.
- IHRKE, P.J., PAPICH, M.G., & DEMANUELLE, C., 1999. The use of fluoroquinolones in veterinary dermatology. *Veterinary Dermatology*, 10(3): 193-204.
- INUI, T., TAIRA, T., MATSUSHITA, T., ENDO, T., 1998. Pharmacokinetic properties and oral bioavailabilities of difloxacin in pig and chicken. *Xenobiotica* 28, 887-893.
- ISMAIL, M., 2006. A pharmacokinetic study of danofloxacin in febrile goats following repeated administration of endotoxin. *J Vet Pharmacol Ther.*;29(4):313-6.
- 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: Mobay Corporation Animal Health Division, Shawnee, Kansas. 5-16.

- JONES, R.B., VAN DER POL, B., JOHNSON, R.B., 1997. Susceptibility of *Chlamydia trachomatis* to trovafloxacin. J Antimicrob Chemother;39(Suppl. B):63–5.
- JONES, M.E., CRITCHLEY, I.A., KARLOWSKY, J.A., BLOSSER-MIDDLETON, R.S., SCHMITZ, F.J., THORNSBERRY, C. Y SAHM, D.F., 2002. In vitro activities of novel nonfluorinated quinolones PGE 9262932 and PGE 9509924 against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* with defined mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV. Antimicrob.Agents Chemother. 46:1651-1657.
- KAMALI, F., ASHTON, C.H., MARSH, V.R., COX, J., 1998. Assessment of the effects of combination therapy with ciprofloxacin and fenbufen on the central nervous systems of healthy volunteers by quantitative electroencephalography. Antimicrob Agents Chemother; 42: 1256-8.
- 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.
- KATO, J., NISHIMURA, Y., IMAMURA, R., NIKI, H., HIRAGA, S. & SUZUKI, H., 1990. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. Cell 63, 393-404.
- KATSUDA, K., KOHMOTO, M., MIKAMI, O., UCHIDA, I., 2009. Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone-resistant *Mannheimia haemolytica* isolates from cattle with bovine pneumonia. Vet Microbiol. ;139(1-2):74-9.
- KEMPF, I., GESBERT, F., GUITTET, M., BENNEJEAN, G., COOPER, A.C., 1992. Efficacy of danofloxacin in the therapy of experimental mycoplasmosis in chicks. Res Vet Sci. ;53(2):257-9.
- KESTEMAN, A.S., FERRAN, A.A., PERRINGUYOMARD, A., LAURENTIE, M., SANDERS, P., TOUTAIN, P.L. AND BOUSQUET-MELOU, A. (2009) Influence of inoculum size and marbofloxacin plasma exposure on the amplification of resistant subpopulations of *Klebsiella pneumoniae* in a rat lung infection model. Antimicrobial agents and chemotherapy, 53, (11)4740-4748.
- KIM, B., MIN, K., CHOI, C., CHO, W.S., CHEON, D.S., KWON, D., KIM, J., CHAE C., 2001. Antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pigs in Korea using new standardized procedures. J Vet Med Sci. ;63(3):341-2.
- KING, D. E., MALONE, R.Y LILLEY, S.H., 2000. New classification and update on the quinolone antibiotics. Am.Fam.Physician 61:2741-2748.

- KITAMURA, A., HOSHINO, K., KIMURA, Y., HAYAKAWA, I., SATO, K., 1995. Contribution of the C-8 substituent of DU-6859a, a new potent fluoroquinolone, to its activity against DNA gyrase mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*;39:1467-71.
- KNOLL, U., GLÜNDER, G., KIETZMANN, M., 1999. Comparative study of the plasma pharmacokinetics and tissue concentrations of danofloxacin and enrofloxacin in broiler chickens. *J Vet Pharmacol Ther.*;22(4):239-46.
- KNUPP, C.A., BARBHAIYA, R.H., 1997. A multiple-dose pharmacokinetic drug interaction study between didanosine (Videx) and ciprofloxacin (Cipro) in male subjects seropositive for HIV but asymptomatic. *Biopharm Durg Dispos*; 18: 65-77.
- 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.
- KUM, C., GOKBULUT, C., SEKKIN, S., BOYACIOGLU, M., 2008. Pharmacokinetics of danofloxacin following intravenous and intramuscular administration in donkeys. *J Vet Pharmacol Ther.*;32(1):105-8.
- LATHERS, C.M. (2002) Clinical pharmacology of antimicrobial use in humans and animals. *Journal of Clinical Pharmacology*, 42, 587-600.
- LAURITZEN, B., LYKKESFELDT, J., FRIIS, C., 2003. Evaluation of a single dose versus a divided dose regimen of danofloxacin in treatment of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs. *Res Vet Sci.*;74(3):271-7.
- LEDOUSSAL, B., ALMSTEAD, J.K., FLAIM, C.P., 1999. Novel fluorquinolone, structure-activity and design of new potent and safe agents. 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco; F-544.
- LEES, P. & SHOJAEE 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.
- LINDECORONA, R.H., FRIIS, C., NIELSEN, J.P., 2000. Pharmacokinetics and penetration of danofloxacin into the gastrointestinal tract in healthy and in *Salmonella typhimurium* infected pigs. *Res Vet Sci.* ;68(3):211-6.

- LIPSKY, B.A., BARKER, C.A., 1999. Fluorquinolone toxicity profiles: A review focusing on newer agents. *Clin Infect Dis*; 28: 352-364.
- LOMAESTRO, B.M., BAILIE, G.R., 1991. Quinolone-cation interactions: A review. *DICP. Ann Pharmacother*; 25: 1249-1258.
- 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.
- 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
- LYNCH, M.J., RICE, J.R., ERICSON, J.F., MOSHER, F.R., MILLAS, W.J., HARRAN, L.P., FRAME, G.M., 1994. Residue Depletion Studies on Danofloxacin in the Chicken. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 289-294
- MA, D., COOK, D.N., ALBERTI, M., PON, N.G., KIKAIDO, H., HEARST, J.E., 1995. Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol*; 16: 45-55.
- MACGOWAN, A.P., BOWKER, K.E., HOLT, H.A., WOOTTON, M., REEVES, D.S., 1997. Bay 12-8039, a new methoxy-quinolone: comparative in-vitro activity with nine other antimicrobials against anaerobic bacteria. *J Antimicrob Chemother*;40:503–9.
- MACGOWAN, A.P., ROGERS, C.A., HOLT, H.A., WOOTON, M., BOWKER, K.E., 2001. Pharmacodynamics of gemifloxacin against *Streptococcus pneumoniae* in an in vitro pharmacokinetic model of infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45, 2916–2921.
- MACGOWAN, A., BOWKER, K., 2002. Developments in PK/PD: optimising efficacy and prevention of resistance. A critical review of PK/PD in in vitro models. *International Journal of Antimicrobial Agents* 19, 291–298.
- 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.

- MANCIBO GONZÁLEZ ALMUDENA, 2011. Estudio de formulaciones convencional y nuevas formulaciones liberación retardada de danofloxacino enrofloxacino en la cabra. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- 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., 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., BAYÓN, A., FERNÁNDEZ-VARÓN, E., ESCUDERO, E., CLAVEL, C., ALMELA, R., CÁRCELES, C.M., 2008. Pharmacokinetics of danofloxacin after single dose intravenous, intramuscular and subcutaneous administration to loggerhead turtles *Caretta caretta*. *Dis Aquat Organ.*;82(3):231-6.
- MARÍN, P., ESCUDERO, E., FERNÁNDEZ-VARÓN, E., RAMÍREZ, M.J., CÁRCELES, C.M., 2010. 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.
- MARTINEZ-MARTINEZ, L., PASCUAL, A. Y JACOBY, G.A., 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 351:797-799.
- 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.
- MATSUO, H., RYU, M., NAGATA, A. Y COLS., 1998. Neurotoxicodynamics of the interaction between ciprofloxacin and foscarnet in mice. *Antimicrob Agents Chemother*; 42: 691-4.
- MAXWELL, A., 1997. DNA gyrase as a drug target. *Trends Microbiol.* 5:102-109.
- MAXWELL, A., CRITCHLOW, S.E., 1998. Mode of action. In: Kuhlman, J., Zeiler, H.J. (Eds.), *Quinolone Antibacterials*. Springer, Berlin, pp. 119–166.
- MC. DONNARD, P.J, CRAIG, W.A., KUNIN, C.M., 1976. Brief antibiotic exposure and effect on bacterial growth. *Chemotherapy*. Ed williams J.D. and Geddes A.M. (Ny), 2: 95-102.
- MC. DONNARD, P.J., CRAIG, W.A., KUNIN, C.M., 1977. Persistent effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* after exposure for limited periods of time. *J. Infect. Dis.*, 135: 2 17-223.
- MC. DONNARD, P.J., WETHERALL, B.L., PRUUL, H., 1981. Postantibiotic leukocyte enhancement: increased susceptibility of bacteria pretreated with antibiotics to activity of leukocyte. *Rev. Infect. Dis.*, 3: 38-44.
- 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., GIBSON, I.F., MCCORMACK, R.Z., 1998. Pharmacokinetics and tissue disposition of danofloxacin in sheep. *Biopharmaceutics and Drug Disposition* 19, 123–129.
- MCKELLAR, Q., GIBSON, I., MONTEIRO, A., BREGANTE, M.,1999. Pharmacokinetics of enrofloxacin and danofloxacin in plasma, inflammatory exudate, and bronchial secretions of calves following subcutaneous administration. *Antimicrob Agents Chemother.*;43(8):1988-92.
- MCKELLAR, Q.A., SANCHEZ BRUNI, S.F., JONES, D.G. (2004) Pharmacokinetic /pharmacodynamic relationships of antimicrobial drugs used in veterinary medicine. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 27, 503-514.

- MCLELLAN, R.A., DROBITCH, R.K., MCLELLAN, H., ACOTT, P.D., CROCKER, J.F., RENTON, K.W., 1995. Norfloxacin interferes with cyclosporine disposition in pediatric patients undergoing renal transplantation. *Clin Pharmacol Ther*; 58: 322-7.
- MELLA S., ACUÑA G., MUÑOZ M., PEREZ C., LABARCA J., GONZALEZ G. 2000. Quinolonas: Aspectos generales sobre estructura y clasificación. *Rev. Chil. Infect.* (12)1:53-66.
- MENGOZZI, G., INTORRE, L., BERTINI, S., SOLDANI, G., 1996. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and intramuscular administration in sheep. *American Journal Of Veterinary Research.*; 57 (7): 1040-1043.
- MERCK VETERINARY MANUAL, 1998. Quinolones. In: Aiello, S., Mays, A. (Eds), Title. Merck & Co., Whitehouse Station, NJ, pp. 1761-1765.
- MESTORINO, N., MARCHETTI, M.L., TURIC, E., PESOA, J., ERRECALDE, J., 2009. Concentrations of danofloxacin 18% solution in plasma, milk and tissues after subcutaneous injection in dairy cows. *Anal Chim Acta.*;637(1-2):33-9.
- 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.
- MIGAKI, T.T., AVAKIAN, A.P., BARNES, H.J., LEY, D.H., TANNER, A.C., MAGONIGLE, R.A., 1993. Efficacy of danofloxacin and tylosin in the control of mycoplasmosis in chicks infected with tylosin-susceptible or tylosin-resistant field isolates of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.* ;37(2):508-14.
- MORSHED, R., PEIGHAMBARI, S.M., 2010. Drug resistance, plasmid profile and random amplified polymorphic DNA analysis of Iranian isolates of *Salmonella enteritidis*. *New Microbiol.* ;33(1):47-56.
- 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.
- 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

- MUÑOZ P, M.J., LLOVERIA, M.P., SANTOS, A.R., ABADIA, J.J., ARAMAYONA, BREGANTEL M.A., 1996. Pharmacokinetics of ciprofloxacin in sheep after single intravenous or intramuscular administration. *Vet Quart* 1996; 18: 45-8
- MUÑOZ, R., DE LA CAMPA, A.G., 1996. ParC subunit of DNA topoisomerase IV of *Streptococcus pneumoniae* is a primary target of quinolones and cooperates with DNA gyrase A subunit in forming resistance phenotype. *Antimicrob Agents Chemother*; 40: 2252-2257.
- NAKAMURA, S., 1997. Mechanisms of quinolone resistance. *J Infect Chemother*; 22 (Suppl. C): 1-8.
- NAKANE, T., IYOBE, S., SATO, K., MITSUHASHI, S., 1995. In vitro antibacterial activity of DU-6859a, a new fluoroquinolone. *Antimicrob Agents Chemother*;39:2822-6.
- 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.
- NEER, T.M., 1988. Clinical pharmacologic features of fluoroquinolone antimicrobials drugs. *Journal of the American Veterinary Medical Association.*; 193 (5): 577-580.
- NEUMAN, M. (1988) Clinical Pharmacokinetics of the newer antibacterial 4-quinolones. *Clinical Pharmacokinetics*, 14, 96-121.
- NEYFAKH, A.A., BIDNENKO, V.E., CHEN, L.B., 1991. Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: Similarities and dissimilarities with the mammalian system. *Proc Natl Acad Sci USA*; 88 :4781-4785.
- NEYFAKH, A.A., 1992. The multidrug efflux transporter of *Bacillus subtilis* is a structural and functional homolog of the *Staphylococcus* NorA protein. *Antimicrob Agents Chemother*; 36: 484-485.
- NEW CH. 1987. Quinolonas: nuevos antimicrobianos con amplias posibilidades de uso. *Clin Med Norteam*;71:663-7.
- NICHOLS, M.D., DEANGELIS, K., KECK, J.L. Y BERGER, J.M., 1999. Structure and function of an archaeal topoisomerase VI subunit with homology to the meiotic recombination factor Spo11. *EMBO J.* 18:6177-6188.
- NIGHTINGALE, C.H., GRANT, E.M., QUINTILIANI, R., 2000. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of levofloxacin. *Chemotherapy* 46 (Suppl 1), 6-14.

- 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.
- NIKAIDO, H., 1996. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J Bacteriol*; 178: 5853-5859.
- NIKAIDO, H., ZGURSKAYA, H.I., 2001. AcrAB and related multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol*; 3: 215-218.
- NORRBY, S.R., 1991. Side effects of quinolones: comparisons between quinolones and other antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 10:378-83.
- OKAZAKI, O., KOJIMA, C., HAKUSUI, H., NAKASHIMA, M., 1991. Enantioselective disposition of ofloxacin in humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35, 2106–2109.
- OLIPHANT, C.M. Y GREEN, G.M., 2002. Quinolones: a comprehensive review. *Am.Fam.Physician* 65:455-464.
- OLOFSSON, S.K., MARCUSSON L.L., KOMP LINDGREN P., HUGHES, D., CARS, O. (2006). Selection of ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* in an in vitro kinetic model: relation between drug exposure and mutant prevention concentration. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57, 1116–1121
- OLOFSSON, S.K., MARCUSSON L.L., STRÖMBÄCK A., HUGHES, D., CARS, O.(2007). Dose-related selection of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60, 795–801.
- 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., 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., ERRECALDE, J.O., 2001b. Enrofloxacin: una fluorquinolona de uso exclusivo en veterinaria. Parte II: Farmacocinética y toxicidad. *Analecta Veterinaria* 21, 1:42-49.

- OWENS, J.R., AMBROSE, P.G., 2002. Pharmacodynamics of quinolones. In: Nightingale, C.H., Murakawa, T., Owens Jr., R.C. (Eds.), *Antimicrobial Pharmacodynamics in Theory and Clinical Practice*. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, pp. 155–176.
- OWENS, J.R., AMBROSE, P.G., 2002b. Torsades de pointes associated with fluoroquinolones. *Pharmacotherapy* 22, 663–668.
- OZAWA, M., BABA, K., SHIMIZU, Y., ASAI, T., 2010. Comparison of in vitro activities and pharmacokinetics/pharmacodynamics estimations of veterinary fluoroquinolones against avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Microb Drug Resist.*;16(4):327-32.
- OZDEMIR, U., LORIA, G.R., GODINHO, K.S., SAMSON, R., ROWAN, T.G., CHURCHWARD, C., AYLING, R.D., NICHOLAS, R.A., 2006. Effect of danofloxacin (Advocin A180) on goats affected with contagious caprine pleuropneumonia. *Trop Anim Health Prod.*; 38(7-8):533-40.
- PALUMBO, M., GATTO, B., ZAGOTTO, G. Y PALU, G., 1993. On the mechanism of action of quinolone drugs. *Trends Microbiol.* 1:232-235.
- PARKER, R.F., MARSH, H.C., 1946. The action of penicillin on *Staphylococcus*. *J. Bacteriol.*, 51: 181-186.
- PASCUAL, A., GARCÍA, I., 1998. Penetración y actividad intracelular de las fluorquinolonas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.*; 16 (3):138-143.
- PASQUALI, F. AND MANFREDA, G. (2007). Mutant prevention concentration of ciprofloxacin and enrofloxacin against *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Veterinary Microbiology* 119, 304-310
- PASTOR, A. & CANTÓN, E., 1999: Interacciones de las bacterias y el antimicrobiano durante la fase de efecto postantibiótico. *Rev. Esp. Quimioterap.*,12(4).
- PATON, J.H., REEVES, D.S., 1992. Adverse reactions to fluorquinolones. *Adverse Drug Reaction Bull*; 153: 575-8.
- PENZHORN, B.L., LEWIS, B.D., LÓPEZ-REBOLLAR, L.M., SWAN, G.E., 2000. Screening of five drugs for efficacy against *Babesia felis* in experimentally infected cats. *J S Afr Vet Assoc.* ;71(1):53-7.
- PÉREZ M., OTERO J.A., BARRERA B., PRIETO J.G., MERINO G., ALVAREZ A., 2012. Inhibition of ABCG2/BCRP transporter by soy isoflavones genistein and daidzein: Effect on plasma and milk levels of danofloxacin in sheep. *The Veterinary Journal* 196 (2013) 203-208.

- PETERSON, L.R., 2001. Quinolone molecular structure-activity relationships: What we have learned about improving antimicrobial activity. *Clin.Infect.Dis.* 33:S180-S186.
- PIDDOCK, L.J., 1994. New quinolones and Gram-positive bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 38, 163-169.
- PIDDOCK, L.J., JONHSON, M., RICCI, V., HILL, S.L., 1998. Activities of new fluorquinolones against fluorquinolone-resistant pathogens of the lower respiratory tract. *Antimicrob Agents Chemother*; 42: 2956-2960.
- PIDDOCK, L.J., 1999. Mechanisms of fluoroquinolone resistance: An update 1994-1998. *Drugs*; 58 (Suppl. 2): 11-18.
- PIDDOCK, L.J., JOHNSON, M.M., 2002. Accumulation of 10 fluoroquinolones by wild-type or efflux mutant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*; 46: 813-820.
- PIERFITTE, C., GILLET, P., ROYER, R.J., 1995. More on fluorquinolone antibiotics and tendon rupture (letter). *N Engl J Med*; 332:193.
- 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.
- PLA, J.M. & OBACH, R., 1982. PERSPECTIVAS TERAPÉUTICAS CON SU FUNDAMENTO FARMACOLÓGICO. (dir: J. Esplugues). *Farmacología general*. Fundación García Muñoz. Valencia. 7: 19-54.
- PLA, J.M. & POZO, A. del, 1974: *MANUAL DE INICIACIÓN A LA BIOFARMACIA* (Farmacocinética aplicada). Romargraf. Barcelona.
- POOLE, K., KREBES, K., MCNALLY, C., NESHAT, S., 1993. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence for involvement of an efflux operon. *J Bacteriol*; 175: 7363-7372.
- POOLE, K., 2000. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44, 2233–2241.
- POUTREL, B., STEGEMANN, M.R., ROY, O., POTHIER, F., TILT, N., PAYNE-JOHNSON, M., 2008. Evaluation of the efficacy of systemic danofloxacin in the treatment of induced acute *Escherichia coli* bovine mastitis. *J Dairy Res.*; 75(3):310-8.
- POZZIN, O., HARRON, D.W.G., NATION, G., TINSON, A.H., SHEEN, R., DHANASEKHARAN, S., 1997. Pharmacokinetics of enrofloxacin following

- intravenous/intramuscular/oral administration in Nedji sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*; 20 (Suppl. 1): 60.
- PULIDO M.M., MOLINA A.J., MERINO G., MENDOZA G., PRIETO J.G., ALVAREZ A., 2006. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 29, 279-287.
- RABBAA, L., DAUTREY, S., COLAS-LINHART, N., CARBON, C., FARINOTTI, R., 1997. Absorption of ofloxacin isomers in the rat small intestine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41: 2274–2277.
- RADANT, J.M., MARCHBANKS, C.R., DUDLEY, M.N., 1992. Interactions of fluorquinolones with other drugs: mechanisms, variability, clinical significance, and management. *Clin Infect Dis*; 14:272-84.
- RAEMDONCK, D.L., TANNER, A.C., TOLLING, S.T., MICHENER, S.L., 1992. In vitro susceptibility of avian *Escherichia coli* and *Pasteurella multocida* to danofloxacin and five other antimicrobials. *Avian Dis.*;36(4):964-7.
- RAEMDONCK, D.L., TANNER, A.C., TOLLING, S.T., MICHENER, S.L., 1994. Antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* and *Salmonella choleraesuis* isolates from pigs. *Vet Rec.* ;134(1):5-7.
- RAHAL, A., KUMAR, A., AHMAD, A.H., MALIK, J.K., & AHUJA, V., 2006. Pharmacokinetics of enrofloxacin in sheep following intravenous and subcutaneous administration. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 29, 321-324.
- 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.
- READ, R.C., MORRISSEY, I., AMBLER, J.E., 2000. *Clinicians manual on respiratory tract infections and fluorquinolones*. Scienci Press, London UK.
- REAL, R., EGIDO, E., PÉREZ, M., GONZÁLEZ-LOBATO, L., BARRERA, B., PRIETO, J.G., ALVAREZ, A.I., MERINO, G., 2010. Involvement of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in the secretion of danofloxacin into milk: interaction with ivermectin. *J Vet Pharmacol Ther.* doi: 10.1111/j.1365-2885.2010.01241.x.
- RENAU, T.E., GAGE, J.W., DEVER, J.A. Y COLS., 1996. Structure-activity relationships of quinolone agents against mycobacteria: Effect of structural modifications at the 8 position. *Antimicrob Agents Chemother*; 40: 2363-2368.

- RIDGWAY, G.L., MUMTAZ, G., GABRIEL, F.G., ORIEL, J.D., 1984. The activity of ciprofloxacin and other 4-quinolones against *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasmas* in vitro. *Eur J Clin Microbiol*;3:344–6.
- RIDGWAY, G.L., O'HARE, M.D., FELMINGHAM, D., GRÜNEBERG, R.N., 1985. The comparative activity of twelve 4-quinolone antimicrobials against *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*. *Drugs Exp Clin Res*;11:259–62.
- ROBLIN, P.M., KUTLIN, A., HAMMERSCHLAG, M.R., 1997. In vitro activity of trovafloxacin against *Chlamydia pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*;41:2033–4.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, J. M., PASCUAL, A., GARCIA, I. Y MARTINEZ-MARTINEZ, L., 2003. Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnr among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing AmpC-type beta-lactamase. *J.Antimicrob.Chemother.* 52:703-706.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, J. M., 2005. [Mechanisms of plasmid-mediated resistance to quinolones]. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* 23:25-31
- ROSEN, T., CHU, D.T.W., LICO, IM, FERNANDES, P.B., MARSH, K., SHEN, L., 1988. Design, synthesis, and properties of (4S)-7-(4-amino-2-substitued-pyrrolinyl) quinolone-3-carboxylic acids. *J Med Chem*; 31: 1598-1611.
- 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.
- ROWAN, T.G., SARASOLA, P., SUNDERLAND, S.J., GILES, C.J., SMITH, D.G., 2004. Efficacy of danofloxacin in the treatment of respiratory disease in European cattle. *Vet Rec.* ;154(19):585-9.
- ROYCHOUDHURY, S. Y LEDOUSSAL, B., 2002. Non-fluorinated quinolones (NFQs): new antibacterials with unique properties against quinolone-resistant gram-positive pathogens. *Curr.Drug Targets.Infect.Disord.* 2:51-65.
- SÁNCHEZ DIAZ, P., 2003. Sistemas MDR y resistencia a los antimicrobianos. *Revis. Española de Quimioterapia.* Vol.16 (Nº 2): 172-187.
- SAPPAL,R., CHAUDHARY, R.K., SANDHU, H.S., SIDHU, P.K., 2009.. Pharmacokinetics, urinary excretion and plasma protein binding of danofloxacin following intravenous administration in buffalo calves (*Bubalus bubalis*). *Vet Res Commun.*; 33(7):659-67.

- SARASOLA, P., LEES, P., ALIABADI, F.S., MCKELLAR, Q.A., DONACHIE, W., MARR, K.A., SUNDERLAND, S.J., ROWAN, T.G., 2002. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles of danofloxacin administered by two dosing regimens in calves infected with mannheimia (pasteurella) haemolytica. antimicrob agents chemother.;46(9):3013-9.
- SÁRKÖZY, G., 2001. Quinolones: a class of antimicrobial agents. Vet. Med.- Czech, 46 (9-10). 257-274.
- SASABE, H., KATO, Y., TERASAKI, T., TSUJI, A. AND SUGIYAMA, Y. (1999). Differences in the hepatobiliary transport of two quinolone antibiotics, grepafloxacin and lomefloxacin, in therat. Biopharmaceutics and Drug Disposition, 20, 151-158.
- 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.
- 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.
- SCHMITZ, F. J., HIGGINS, P.G., MAYER, S., FLUIT, A.C. Y DALHOFF, A., 2002. Activity of quinolones against gram-positive cocci: Mechanisms of drug action and bacterial resistance. Eur. J Clin. Microbiol. Infect. Dis. 21:647-659.
- SCHRICKX, FINK-GREMMELS, 2008. Implication of ABC transporters of the disposition of typical veterinary medicinal products. Eur. J of Pharmacology 585 (2008) 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 danofloxacin from the blood into the milk of ewes. Vet Res.;28(6):571-9.
- SHEM-TOV, M., RAV-HON, O., ZIV, G., LAVI, E., GLICKMAN, A., SARAN, A.,1998. Pharmacokinetics and penetration of danofloxacin from the blood into the milk of cows. J Vet Pharmacol Ther.;21(3):209-13.

- SHIBA, K., SAKAI, O., SHIMADA, J., 1992. Effect of antacids, ferrous sulfate, and ranitidine on absorption of DR-3355 in humans. *Antimicrob Agents Chemother*; 36:2270-4.
- 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.
- SMITH, J.T., LEWIN C.S., 1988. Chemistry and mechanisms of action of the quinolone antibacterials. In: Andriole VT (ed): *The quinolones*. Academic Press, London, p. 23-82.
- SÖRGEL, F. AND KINZIG, M. (1993) Pharmacokinetics of gyrase inhibitors. Part 2: renal and hepatic elimination pathways and drug interactions. *American Journal of Medicine*, 94, 56- 59.
- SPENCER, R.C., 1998. The role of antimicrobial agents in the aetiology of *Clostridium difficile*-associated disease. *J Antimicrob Chemother*;41(Suppl C):21–7.
- STAHLMANN, R., 1990. Safety profile of the quinolones. *J Antimicrob Chemother* 26 (Supple D): 31-44.
- STEIN, G.E., 1988. The 4-quinolone antibiotics: Past, present and future. *Pharmacotherapy*; 8: 301-314.
- STEIN, G.E., 2000. The methoxyfluoroquinolones: gatifloxacin and moxifloxacin *Infect. Med.*, 17(8): 564-570.
- SUMANO, L.H., 1993. Quinolonas y fluorquinolonas en medicina veterinaria. *Veterinaria México*; 24 (2): 83-92.
- 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.
- SUNDERLAND, S.J., SARASOLA, P., ROWAN, T.G., GILES, C.J., SMITH, D.G., 2003. Efficacy of danofloxacin 18% injectable solution in the treatment of *Escherichia coli* diarrhoea in young calves in Europe. *Res Vet Sci.*; 74(2):171-8.

- SUTO, M.J., DOMAGALA, J.M., ROLAND, G.E., MAILLOUX, G.B., COHEN, M.A., 1992. Fluorquinolones: relationships between structural variations, mammalian cell cytotoxicity, and antimicrobial activity. *J Med Chem*; 35: 4745-50.
- SZARFMAN, A., CHEN, M., BLUM, M.D., 1995. More on fluorquinolone antibiotics and tendon rupture (letter). *N Engl J Med*; 332:193.
- 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.
- TANNER, A.C., AVAKIAN, A.P., BARNES, H.J., LEY, D.H., MIGAKI, T.T., MAGONIGLE, R.A., 1993. A comparison of danofloxacin and tylosin in the control of induced *Mycoplasma gallisepticum* infection in broiler chicks. *Avian Dis.*;37(2):515-22.
- TELLIER, R. Y KEYSTONE., J.S., 1992. Prevention of traveler's diarrhea. *Infect.Dis.Clin.North Am.* 6:333-354.
- TILLOTSON, G.S., 1996. Quinolones: structure-activity relationships and future predictions. *J Med Microbiol.*; 44: 320-4.
- TITOS ARCOS, J.C., 2010. Estudio de formulaciones convencional y nuevas formulaciones de liberación retardada de enrofloxacin en la cabra. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- 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. AND LEES, P. (2004) Integration and modeling of pharmacokinetic and pharmacodynamic data to optimize dosage regimens in veterinary medicine *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 27, 467-477.
- TRAN, J.H. Y JACOBY, G.A., 2002. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:5638-5642.
- TRAN, J.H., JACOBY, G.A. Y HOOPER, D.C., 2005. Interaction of the plasmid encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:118-125
- TULKENS, P.M., 1991. Intracellular distribution and activity of antibiotics. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*; 10: 100-106.

- 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).
- 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.
- VESGA, O., CONKLIN, R., STAMSTAD, T., CRAIG, W.A., 1996. Pharmacodynamic activity of Bay 12-0839 in animal infection models. In: Abstracts of the 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, New Orleans, LA. American Society for Microbiology, Washington, DC, p. 123. Abstract F22.
- VINCENT, J., HUNT, T., TENG, R., ROBARGE, L., WILLAVIZE, S.A. & FRIEDMAN, H.L., 1998. The pharmacokinetic effects of coadministration of morphine and trovafloxacin in healthy subjects. *Am. J. Surg.* 176(A Suppl)):32S-38S.
- VILA, J., RUIZ, J., MARCO, F., BARCELO, A., GONI, P., GIRALT, E. Y JIMENEZ, D.A., 1994. Association between double mutation in gyrA gene of ciprofloxacinresistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:2477-2479.
- VISALLI, M.A., JACOBS, M.R., APPELBAUM, P.C., 1996. MIC and time-kill study of activities of DU-6859a, ciprofloxacin, levofloxacin, sparfloxacin, cefotaxime, imipenem, and vancomycin against nine penicillin-susceptible and -resistant pneumococci. *Antimicrob Agents Chemother*;40:362-6.
- VISALLI, M.A., JACOBS, M.R., APPELBAUM, P.C., 1997. Antipneumococcal activity of BAY 12-8039, a new quinolone, compared with activities of three other quinolones and four oral b-lactams. *Antimicrob Agents Chemother*;41:2786-9.
- VOGELMAN, B.S, CRAIG W.A., 1985. Postantibiotic effects. *J. Antimicrob. Chemother.*, 15 (Supp. A): 37-41.
- VOGELMAN, B.S., GUDMUNDSSON, S., TURNIDGE, J., 1988. In vivo postantibiotic effect in a thigh infection in neutropenic mice. *J. Infect. Dis.*, 157(Nº2): 287-298.
- VON ROSENSTIEL, N., ADAM, D., 1994. Quinolone antibacterials. An update of their pharmacology and therapeutic use. *Drugs*; 47: 872-901.

- 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.
- WALKER, R.D., 2000. The use of fluoroquinolones for companion animal antimicrobial therapy. *Australian Veterinary Journal* 78, 84–90.
- WALKER, R.D. and Dowling, P.M. (2006) en *Fluoroquinolones. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. Ed. Iowa State University Press, Ames. 263-284. R. D. Walker.
- 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.
- WANG, M., TRAN, J.H., JACOBY, G.A., ZHANG, Y., WANG, F. Y HOOPER, D.C., 2003. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:2242-2248.
- 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.
- WEBER, M.A., PIDDOCK, L.J.V., 2003. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51, 9-11
- 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. (2005). Comparative Mutant Prevention Concentrations of pradofloxacin and other veterinary fluoroquinolones indicate differing potentials in preventing selection of resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Oct. p 4166–4173
- WILSON, D.A., ROUNSON, G.N., 1979. The recovery period following exposure of bacteria to penicillins. *Chemother.*, 25: 14-22.
- WISE, R., 1991. Comparative penetration of selected fluoroquinolones into respiratory tract fluids and tissues. *The American Journal Of Medicine.*; 91 (suppl. 6A): 67s-70s.

- WISE, R., BRENWALD, N.P., ANDREWS, J.M., BOSWELL, F., 1997. The activity of methylpiperazinyl fluoroquinolone CG 5501: a comparison with other fluoroquinolones. *J Antimicrob Chemother*;39:447–52.
- WOLFSON, J.S., HOOPER, D.C., 1989. Fluorquinolone antimicrobials agents. *Clin Microbiol Rev*; 2: 378-424.
- WOLFSON, J.S., HOOPER, D.C. 1991. Overview of fluorquinolone safety. *Am J Med*; 9 (Suppl 6A):153S-61.
- WOODCOCK, J.M., ANDREWS, J.M., BOSWELL, J.F., BRENWALD, N.P., WISE, R., 1997. In vitro activity of BAY 12-8039, a new fluoroquinolone. *Antimicrob Agents Chemother*;41:101–6.
- WRIGHT, D.H., BROWN, G.H., PETERSON, M.L., ROTSCHAFER, J.C., 2000. Application of fluoroquinolone pharmacodynamics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46, 669–683.
- 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.
- YAMAMOTO, K., KIJIMA, M., YOSHIMURA, H., TAKAHASHI, T., 2001. Antimicrobial susceptibilities of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from pigs with swine erysipelas in Japan, 1988-1998. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. ;48(2):115-26.
- YAMAOKA, K., NAKAGAWA, T. & UNO, T., 1978. Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *J. Pharm. Biopharm.*, 6: 165-175.
- 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.

- YOSHIDA, H., BOGAKI, M., NAKAMURA, M., NAKAMURA, S., 1990. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*; 34: 1271-1272.
- YOSHIDA, T., UEGUCHI, C., MIZUNO, T., 1993. Physical map location of a set of *Escherichia coli* genes (*hde*) whose expression is affected by the nucleoid protein H-NS. *J.Bacteriol.* 175:7747-7748
- YOSHIDA, T., YAMAMOTO, Y., ORITA, H., KAKIUCHI, M., TAKAHASHI, Y., ITAKURA, M., KADO, N., MITANI, K., YASUDA, S., KATO, H. Y ITOH., Y., 1996. Studies on quinolone antibacterials. IV. Structure-activity relationships of antibacterial activity and side effects for 5- or 8-substituted and 5,8-disubstituted-7-(3-amino-1-pyrrolidinyl)-1-cyclopropyl-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acids. *Chem.Pharm.Bull.(Tokyo)* 44:1074-1085.
- YOSHIMURA, H., TAKAGI, M., ISHIMURA, M., ENDOH, Y.S., 2002. Comparative in vitro activity of 16 antimicrobial agents against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Res Commun.*;26(1):11-9.
- ZHANG, S., YANG, X. & MORRIS, M.E. 2004. Combined effects of multiple flavonoids on breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport. *Pharmaceutical Research*, 21, 1263–1273.
- ZELLER, V., JANOIR, C., KITZIS, M.D., GUTMANN, L., MOREAU, N.J., 1997. Active efflux as a mechanism of resistance in ciprofloxacin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*;41:1973-8.
- 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.
- ZHAO, B.Y., PINE, R., DOMAGALA, J., DRLICA, K., 1999. Fluorquinolone action against clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*: Effects of a C-8 methoxy group on survival in liquid media and in human macrophages. *Antimicrob Agents Chemother*; 43: 1783-1787.

- ZECHIEDRICH, E. L., KHODURSKY, A.B. Y COZZARELLI N.R., 1997. Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 11:2580-2592.
- ZENG, Z., DENG, G., SHEN, X., RIZWAN-UL-HAQ, M., ZENG, D., DING, H., 2010. Plasma and tissue pharmacokinetics of danofloxacin in healthy and in experimentally infected chickens with *Pasteurella multocida*. *J Vet Pharmacol Ther.*;34(1):101-4. doi: 10.1111/j.1365-2885.2010.01223.x.

11-. 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.

-**λ_z**: Constante híbrida de disposición lenta.

-MAT: Tiempo medio de absorción.

-MRT: Tiempo medio de residencia.

- $t_{m\acute{a}x}$: 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.

- $t_{1/2\lambda 1}$: 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.

- **OTRAS**

-CMI: 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.

-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.

-NAC: Neumonía adquirida en comunidad o extrahospitalaria.

-PK-PD: Farmacocinética-Farmacodinamia.

-p.o.: por vía oral.

-SC: Subcutánea.

-SNC: Sistema Nervioso Central.

-spp.: especies.