



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“FARMACOCINÉTICA Y EFICACIA CLÍNICA DE UNA NUEVA FORMA RE-  
CRISTALIZADA DE ENROFLOXACINA CONTRA *Leptospira interrogans* EN  
HAMSTER SIRIO (*Mesocricetus auratus*)”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

**ALMA ALICIA CARRASCOSA OROZCO**

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. LILIA GUTIÉRREZ OLVERA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:

DRA. MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD

FACULTAD DE QUÍMICA UNAM

DR. ALEJANDRO DE LA PEÑA MOCTEZUMA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA UNAM

**MÉXICO DF**

JULIO

**2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo con mucho respeto y cariño al Dr. Arturo Federico Olguín y Bernal, excelso académico de esta facultad y un hermoso ser humano en quien siempre he sabido encontrar un amigo incondicional.

A mis padres por su disciplina y cariño. Gracias por haberme educado así, estoy orgullosa de ser como soy.

A mis compañeras y amigas; Dra. Heidi Zozaya Doering y MVZ MC Lizbeth Yesenia Carrillo González, gracias por soportarme y conformar mi trisquel.

A las personas que encontré en Querétaro; mi querida hermana MVZ MC Miriam Plata Rodríguez, no hay palabras suficientes para agradecer tanto apoyo, a mi querido amigo Dr. José Alfredo Carranza Velázquez, gracias por siempre hacerme reír, al Dr. Javier Cisneros Yedra, gracias por ser una nueva y hermosa adición a mi vida, gracias por la amistad, por escucharme, por apoyarme, por comprenderme, por todo.

A todos los amigos que he tenido el honor de conocer a lo largo de mi vida, quienes han sido mi familia, ya que la familia no siempre es de sangre, son las personas en tu vida que te quieren en la suya, que te aceptan por quien eres y te aman incondicionalmente, me considero muy afortunada porque la lista es larga, ustedes saben quiénes son y cuanto los quiero.

MI HONOR ES MI LEALTAD

## AGRADECIMIENTOS

A la UNAM; máxima casa de estudios de donde orgullosamente soy egresada y a la FMVZ donde encontré mi segundo hogar.

A CONACYT por el apoyo brindado para la realización de este proyecto.

A todo el personal del programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal por todo el esfuerzo que hacen para que esto funcione.

A mis asesores; Dra. Lilia Gutiérrez Olvera, María Josefa Bernad Bernad, Dr. Alejandro de la Peña Moctezuma, y a los siguientes académicos cuya participación fue vital en este proyecto; Dr. Héctor Sumano López, Dra. Graciela Tapia Pérez y Dra. Irma Eugenia Candanosa Aranda, gracias en verdad a todos por su apoyo, cariño y confianza.

Al Dr. Luis Ocampo Camberos, Dr. Jesús Gracia Mora, Dr. Jorge Miranda Calderón y al Dr. David Quintanar Guerrero por conformar el jurado de mi examen y apoyarme con sus valiosos comentarios y consejos.

Así como a todos los académicos de mi vida que han contribuido con mi formación académica y personal.

A los integrantes del GrILLeP (Grupo de Investigación en Leptospira y Leptospirosis), personal del USEDICO y todos los nuevos amigos que conocí en el CEIEPAA.

A la Sra. Feliza Carlota González González, por su cálido y valioso apoyo con en el laboratorio de Farmacología, a la Sra. María del Roció Valdés Murillo, por su alegre disposición para ayudarme con el corte, fijación y tinción de las laminillas de mi trabajo, al Sr Daniel Monroy González por su amabilidad y estar al pendiente del material necesario en el laboratorio de microbiología.

A TODOS LOS HÁMSTERES UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO

## RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad bacteriana, considerada como la zoonosis re-emergente de mayor distribución a nivel mundial. Es una enfermedad potencialmente mortal pero tratable, en México es una enfermedad ampliamente distribuida en áreas rurales y urbanas. A nivel mundial se reportan cada año más de medio millón de casos en humanos con una mortalidad superior al 20%. Las fluoroquinolonas no son una opción terapéutica contra leptospirosis, sin embargo mediante la re-cristalización se aprecian características de solubilidad y biodisponibilidad superiores a las sales comerciales, mejorando las propiedades farmacocinéticas/farmacodinámicas (PK/PD) logrando así concentraciones terapéuticas útiles para el tratamiento en infecciones por *Leptospira interrogans*. Dado que el hámster sirio (*Mesocricetus auratus*) es considerado como el biomodelo más susceptible en estudios con *Leptospira interrogans*, se utilizó como modelo base para el presente trabajo. 36 hámsteres sirios divididos en 2 grupos fueron inoculados vía intramucosa de los abazones con la cepa LOCaS46 de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola (3,981 leptospirosis/mL). Al grupo grupo1: Baytril® Bayer (ER) se le administró vía subcutánea una dosis de 10 mg/kg cada 24 horas durante 7 días; al grupo 2: enrofloxacin recrystalizada (EC) se le administró vía subcutánea una dosis de 10 mg/kg cada 24 horas durante 7 días, ambos grupos fueron monitoreados diariamente durante los siguientes 28 días, se realizaron estudios histopatológicos, serológicos, cultivo y PCR. El grupo tratado con ER presento una mortalidad del 38.8%, mientras que en el grupo de EC no hubo muertes a consecuencia de la enfermedad. En el estudio farmacocinético de suero y tejidos, otros 90 hámsteres fueron dosificados a la misma razón y divididos en grupos, obteniendo muestras de suero a las 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48,60 y 84 horas y de tejidos a las 4, 12, 24, 48 y 72 horas (corazón, pulmón, hígado, riñón, intestino delgado, intestino grueso, piel, grasa y músculo) y ser analizados por un método cromatográfico con lector UV. El grupo EC tuvo valores de  $C_{MAX}$  (concentración plasmática máxima) y AUC (área bajo la curva) 6.7 y 23 veces superiores respectivamente, así mismo permaneció por más de 60

horas en suero y tejidos. Lo cual puede justificar el uso del nuevo cristal de enrofloxacin como tratamiento contra leptospirosis en otras especies dom3sticas.

**Palabras clave:** farmacocin3tica, enrofloxacin, *Leptospira interrogans*, hámster sirio (*Mesocricetus auratus*).

## ABSTRACT

Leptospirosis is considered the re-emerging zoonosis most extensively distributed worldwide. It is a potentially fatal, but treatable disease. More than a half million human cases are reported globally every year, with a mortality rate of more than 20 %. In Mexico it is widely distributed in rural and urban areas. Fluoroquinolones are traditionally not considered an option against leptospirosis. However a new enrofloxacin crystal (EC) has been obtained through manipulation with better solubility and bioavailability properties than existing commercial salts. Its pharmacokinetics/pharmacodynamics ratio (PK/PD) has been improved, thus achieving therapeutic concentrations useful for treating the infection with *Leptospira interrogans*. The golden hamster (*Mesocricetus auratus*) was used as the base model for this study, as it is considered the most susceptible biomodel for *Leptospira interrogans* studies. 36 Syrian hamsters divided into 2 groups were inoculated with LOCaS46 strain of *Leptospira interrogans* serovar Canicola (3,981 bacteria/mL) through the intramucosal route at the cheek pouches. Group 1 was treated with the reference enrofloxacin (ER) Baytril® at a dose of 10 mg/kg subcutaneously every 24 hours during seven days; Group 2 was treated with enrofloxacin crystal (EC) at dose of 10 mg/kg subcutaneously every 24 hours during seven days. Both groups were monitored daily for the next 28 days, and histopathology, serology, culture and PCR were done. The ER group presented a mortality of 38.8%, while the EC group presented no deaths associated with the disease. Pharmacokinetic studies were done by dividing 90 hamsters into groups and administering the reference enrofloxacin (ER) and enrofloxacin crystal (EC) at the same dose, obtaining serum samples at fixed intervals of 1,2,4,8,12,24,48,60 and 84 hours, and tissue samples (heart, lung, liver, kidney, small intestine, large intestine, skin, fat and muscle) at fixed intervals of 4, 12, 24, 48 and 72 hours. The samples were analyzed with a chromatographic method with UV reader. The EC group presented a maximum plasma concentration (C<sub>max</sub>) and area under the curve (AUC) 6.7 and 23 higher times respectively as the ER group. The mean

residence time (MRT) for serum and tissues was up to 60 hours. These results give EC a high potential for treating leptospirosis in other domestic species.

**Key words:** pharmacokinetic, enrofloxacin, *Leptospira interrogans*, golden hamster (*Mesocricetus auratus*).

## INDICE

<b>Resumen.....</b>	<b>4</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>6</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>18</b>
1.1 Marco histórico.....	19
1.2 Leptospirosis en México.....	21
1.3 Patogenia.....	23
1.4 Signos clínicos.....	24
1.5 Hámster sirio.....	25
1.6 Diagnóstico.....	26
1.7 Tratamiento.....	28
1.8 Fluoroquinolonas.....	29
1.9 Enrofloxacin.....	30
1.10 Propiedades fisicoquímicas de la enrofloxacin.....	30
1.11 Mecanismo de acción.....	31
1.12 Farmacocinética de la enrofloxacin.....	32
1.13 Relación farmacocinética/farmacodinamia (PK/PD) de la enrofloxacin .....	34
1.14 Enrofloxacin re-cristalizada.....	35

<b>2.- Justificación.....</b>	<b>36</b>
<b>3.- Hipótesis.....</b>	<b>37</b>
<b>4.- Objetivos.....</b>	<b>38</b>
<b>5.- Material y métodos.....</b>	<b>39</b>
5.1. Fase I. Farmacocinética (suero y tejido).....	39
5.1.1. Farmacocinética en suero.....	39
5.1.2. Farmacocinética en tejidos.....	43
5.2. Fase II. Desafío.....	45
5.2.1 .Necropsia e histopatología.....	46
5.2.2 Microscopia de campo obscuro.....	47
5.2.3 Cultivo bacteriológico.....	47
5.2.4 Aglutinación microscópica.....	47
5.2.5 Metodología de extracción de ADN a partir de tejidos.....	48
5.2.6 PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).....	48
<b>6.- Resultados .....</b>	<b>49</b>
6.1 Fase I. Farmacocinética en suero y tejido.....	49
6.2 Fase II Desafío.....	56
6.2.1. Necropsia e histopatología.....	59
6.2.2. Campo obscuro.....	67
6.2.3. Cultivo.....	67
6.2.4. Aglutinación microscópica (AM).....	69

6.2.5. PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).....	70
<b>7.- Discusión.....</b>	<b>73</b>
<b>8.- Conclusiones.....</b>	<b>75</b>
<b>9.-Referencias Bibliográficas.....</b>	<b>76</b>

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.- Modelo de obtención de muestras de sangre de los hámsteres por medio de un muestreo tipo “Pool Sampling” .....	39
Cuadro 2.- Número de animales y hora post inoculo del antibiótico a la cual se les aplico eutanasia.....	43
Cuadro 3.- Grupos y subgrupos; todos fueron inoculados con la cepa virulenta de leptospira excepto el grupo control negativo, que únicamente recibió el tratamiento (3 animales para cada enrofloxacin). .....	45
Cuadro 4.- Variables farmacocinéticas en suero de los 2 grupos (ER y EC) después de una aplicación parenteral a dosis de 10 mg/kg.....	50
Cuadro 5. Concentraciones pulmonares de los 2 grupos evaluados con enrofloxacin a dosis de 10 mg/kg.....	51
Cuadro 6. Concentraciones hepáticas de los 2 grupos evaluados con enrofloxacin a dosis de 10 mg/kg.....	52
Cuadro 7. Concentraciones renales de los 2 grupos evaluados con enrofloxacin a dosis de 10 mg/kg.....	52
Cuadro 8. Concentraciones en duodeno de los 2 grupos evaluados con enrofloxacin a dosis de 10 mg/kg.....	52
Cuadro 9. Concentraciones en ciego de los 2 grupos evaluados con enrofloxacin a dosis de 10 mg/kg.....	53
Cuadro 10. Concentraciones en corazón de los 2 grupos evaluados con enrofloxacin a dosis de 10 mg/kg.....	53

Cuadro 11. Concentraciones en piel de los 2 grupos evaluados con enrofloxacin a dosis de 10 mg/kg.....	53
Cuadro 12. Concentraciones en grasa de los 2 grupos evaluados con enrofloxacin a dosis de 10 mg/kg.....	54
Cuadro 13. Concentraciones en musculo de los 2 grupos evaluados con enrofloxacin a dosis de 10 mg/kg.....	54
Cuadro 14.- Principales lesiones macroscópicas y microscópicas en los 4 animales del grupo control positivos muertos al octavo día post infecci3n.....	60
Cuadro 15.- Identificaci3n del hámster del grupo tratado con Baytril y día de sacrificio post infecci3n durante el estudio.....	61
Cuadro 16.-Observaciones positivas de leptospiras en tejido renal a diferentes días.....	68
Cuadro 17.- Número de animales positivos a la titulaci3n de <i>Leptospira interrogans</i> serovariedad Canicola mediante la prueba de extensi3n de diluciones.....	69

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Pesaje de los animales para una dosificación precisa de la enrofloxacin para cada grupo, la primer muestra de sangre se obtuvo bajo los efectos anestésicos del isofluorano, la segunda y última muestra se obtuvo inmediatamente después a la sobredosis del anestésico inhalado.....	40
Figura 2.- Cromatograma modelo de la técnica analítica.....	41
Figura 3.- Obtención de los órganos después del método eutanásico mediante sobredosis de anestesia inhalada, para el posterior pesaje y macerado de cada tejido.....	44
Figura 4.- Previa inducción mediante anestesia inhalada (isofluorano), se inoculo un volumen total de 0.1 mL vía intramucosa de los abazones.....	45
Figura 5.- Mediante báscula y termómetro digital fue posible llevar un registro diario de los hámsteres durante el estudio.....	46
Figura 6.- Órganos de hámsteres muertos por enfermedad, previamente fijados en formol al 10 % para ser cortados y procesados en el Histokinette.....	47
Figura 7.- Secuencia de los iniciadores utilizados y su posición en el genoma de LipL32 de <i>Leptospira interrogans</i> serovariedad Canicola.....	49
Figura 8. Concentraciones séricas de ambos preparados de enrofloxacin en hámster sirio ( <i>Mesocricetus auratus</i> ) tras la administración parenteral (subcutánea) a razón de 10 mg/kg.....	51
Figura 9.- Concentraciones en pulmón, hígado y riñón, tras una sola dosis parenteral 10 mg/kg (subcutáneo) de cada una de las enrofloxacinas (ER y EC) en hámster sirio ( <i>Mesocricetus auratus</i> ).....	55
Figura 10.- Concentraciones en corazón, duodeno y ciego, tras una sola dosis parenteral 10 mg/kg (subcutáneo) de cada una de las enrofloxacinas (ER y EC) en hámster sirio ( <i>Mesocricetus auratus</i> ).....	55

Figura 11.- Concentraciones en piel, grasa y músculo estriado tras una sola dosis parenteral 10 mg/kg (subcutáneo) de cada una de las enrofloxacinas (ER y EC) en hámster sirio ( <i>Mesocricetus auratus</i> ).....	56
Figura 12. Comportamiento de peso de cada uno de los hámsteres para los dos grupos durante los 28 días que se evaluó el proceso de infección.....	57
Figura 13.- Temperatura corporal de los hámsteres para los dos grupos, EC y ER durante los 28 días de evaluación.....	58
Figura 14- Se muestran los 4 animales controles positivos muertos por enfermedad al día 8 post-inoculo.....	59
Figura 15.- Comparación del grado de lesiones después del análisis histopatológico de cada uno de los hámsteres para cada grupo.....	61
Figura 16.- Lesiones macroscópicas y microscópicas en parénquima.....	63
Figura 17.- Lesiones vasculares en pulmón y corazón.....	64
Figura 18.- Lesiones macroscópicas y microscópicas en hígado.....	64
Figura 19.- Lesiones esplénicas.....	65
Figura 20 – Enteritis hemorrágica.....	65
Figura 21.- Vejiga con hematuria y cortes histopatológicos mostrando lesiones renales.....	66
Figura 22.- Comparación de cortes histológicos de tejido renal de un hámster tratado con EC (B,D) y tejido renal de un hámster tratado con ER(A,C).....	66
Figura 23.- Imagen de <i>Leptospira interrogans</i> mediante microscopia de campo oscuro.....	67
Figura 24.- Días de observación del cultivo para ambos grupos.....	68
Figura 25.- Representación gráfica de los títulos de anticuerpos para cada grupo ER y EC.....	70

Figura 26.- PCR a partir de ADN de tejido renal de los 4 hámsteres sirios control positivo.....71

Figura 27.- PCR a partir de ADN de tejido renal de los 18 hámsteres sirios tratados con ER.....71

Figura 28.- PCR a partir de ADN de tejido renal de los 18 hámsteres sirios tratados con EC.....72

## ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
AM	Aglutinación microscópica
AUC	Área bajo la curva
CID	Coagulación intravascular diseminada
Cl	Aclaramiento plasmático
C <sub>MAX</sub>	Concentración plasmática máxima
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DL50	Dosis letal 50
EC	Enrofloxacin re-cristalizada
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
EMJH	Ellinghausen y McCullough modificado por Johnson y Harris
ER	Enrofloxacin referencia Baytril® Bayer
EV	Endovenoso
F	Biodisponibilidad
H	Hora
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
Kg	Kilogramo
L	Litro

LPS	Lipopolisacarido
Mg	Miligramo
$\mu\text{g}$	Microgramo
mL	Mililitro
MRT	Tiempo medio de resistencia
MVZ	Medico veterinario zootecnista
O.I.E	Oficina internacional de epizootias
PA	Principio activo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
RPM	Revoluciones por minuto
T	Tiempo
$T_{1/2\beta}$	Vida media de eliminación
$T_{MAX}$	Tiempo que tarda en alcanzar la $C_{MAX}$
TNF	Factor de necrosis tumoral
UV	Ultravioleta

## 1. INTRODUCCIÓN

Leptospirosis es una enfermedad aguda y febril considerada actualmente la zoonosis de mayor distribución mundial, de reporte obligatorio en muchos países, siendo además una enfermedad re-emergente que afecta al humano y a prácticamente todos los mamíferos tanto domésticos como silvestres incluidos mamíferos marinos (Haake y Levett, 2015).

En humanos se estiman más de medio millón de nuevos casos de leptospirosis al año a nivel mundial, la incidencia se encuentra en un rango de 0.1 a 1 por cada 100,000 habitantes en climas templados y de 10 a 100 en climas tropicales, cuando surgen brotes la incidencia de casos sobrepasa los 100 habitantes por cada 100,000 (Hartskeer et al., 2011) y de estos la mortalidad excede el 20% (Sikkema et al., 2010).

Encontrando mayor prevalencia en áreas tropicales y subtropicales, destacando la importancia de diseminación en humanos por el incremento de viajes internacionales recreacionales (Haake y Levett, 2015).

La información epidemiológica sobre la leptospirosis tanto en animales como en humanos en México es limitada, no se cuentan con datos precisos de morbilidad, mortalidad ni prevalencia, los casos se estudian de manera independiente y en su mayoría no están bien documentados (Arteaga et al., 2015). Las condiciones climáticas en nuestro país favorecen la prevalencia y diseminación del microorganismo.

La epidemiología es compleja debido al amplio rango de posibles hospedadores, diversidad de nichos ecológicos y presentaciones clínicas. Se puede entender en dos amplias categorías; leptospirosis adaptada y no adaptada al hospedero, esto es, un animal infectado con una serovariedad adaptada se comporta como un hospedero de “mantenimiento” o “reservorio”, en tanto la exposición de animales susceptibles a serovariedades no adaptadas produce una enfermedad finalmente accidental. Cada serovariedad tiene un hospedero de mantenimiento en particular,

aunque pueden causar enfermedad en cualquier especie de mamíferos (Lemarroy y Carrillo, 2003).

Son reservorios naturales los animales con enfermedad crónica, mamíferos portadores asintomáticos y reservorios naturales como las ratas (*Rattus norvegicus*), constituyen un factor que predispone la prevalencia de la enfermedad en el medio. Las leptospiras patógenas se alojan en los túbulos contorneados proximales del riñón y son excretadas con la orina durante meses o años. Las condiciones ambientales que influyen en la supervivencia del organismo fuera del huésped son: la humedad, suelos con pH alcalino y las temperaturas entre 18-30 °C, sin embargo ha sido posible aislar al microorganismo en agua marina (Costa et al., 2014; Barragán et al., 2011).

Las infecciones en animales o en el ser humano ocurren en forma directa, mediante el contacto con orina de animales enfermos o portadores, o indirecta, por el contacto con agua contaminada (Prescott, 2008).

La enfermedad se ha registrado en una gran variedad de especies domesticas que incluyen a los animales de compañía como perros y caballos, y al ganado (bovinos, cerdos y no muy frecuentemente en ovejas y cabras), siendo además del potencial riesgo de contagio, el impacto económico a causa de las fallas reproductivas y/o muerte que ocasiona la enfermedad en los animales (Wagner et al., 2008; Wendy et al., 2006). La leptospirosis está incluida dentro de la lista B de la Oficina Internacional de Epizootias (O.I.E.), estando por ello obligados los países miembros a realizar un informe mensual y/o anual (Andicoberry et al., 2001).

## **1.1 MARCO HISTÓRICO**

La leptospirosis fue reconocida como un riesgo ocupacional de los cosechadores de arroz en la China antigua (Weil, 1886). En Japón se le denominó Akiyami (fiebre de otoño), término que se continúa utilizando en la actualidad (Weil, 1886).

En la literatura cuneiforme mesopotámica alrededor del año del 2,500 AC se puede encontrar menciones de signos patológicos, como ictericia, hemorragia, fiebre, que bien podrían calificarse como síntomas de leptospirosis, dado que las ratas eran abundantes. Lo mismo puede decirse de Egipto, donde en los papiros médicos se mencionan síntomas y cuadros patológicos. Los que estudiaron estos papiros coinciden con lo que relatan Manson y Bahr (1948) que es posible que sea lo que describió Larrey (1800) (médico del ejército de Napoleón) en Egipto como ictericia contagiosa con hemorragia, la que era conocida ahí desde antaño.

En 1886, Adolph Weil en Heidelberg, Alemania, la describió minuciosamente, observando cuatro casos clínicos en seres humanos (cuadros febriles e ictericos cursando con falla renal). Posteriormente fue designada por Goldschmidt, como “Enfermedad de Weil”. La primera visualización la realizó Arthur Stimson mediante tinciones argenticas a partir de tejido renal de pacientes que padecían fiebre amarilla (Stimson, 1907).

El primer aislamiento de leptospiras patógenas en cultivo puro se logró por un grupo de investigadores japoneses dirigidos por Inada e Ido en 1914, encuentran lo que reportan una espiroqueta, por presentar forma de espiral, en el hígado de cobayos infectados con sangre de mineros febriles; de manera experimental inocularon el agente en cobayos, en los cuales observaron fenómenos hemorrágicos y es por esta razón que llamaron al agente encontrado como *Spirochaeta icterohaemorrhagica japonica*, posteriormente cambiado solo a: *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* (Inada et al., 1916).

Contemporáneamente en Alemania dos grupos de investigadores de manera independiente realizaron asilamientos en cobayos denominando a los organismos encontrados: *Spirochaeta nodosa* y *Spirochaeta icterogenes* (Faine et al., 1999).

Los extremos de esta espiroqueta tienen forma de gancho por lo que Stimson la nombró “*Spirochoeta interrogans*” por el parecido a un signo de interrogación (Stimson, 1907).

El papel de los roedores como una fuente de infección para el humano fue reconocido en 1917 por Inada e Ido (Japón), observando espiroquetas en tejido renal y orina de ratas y ratones de ciudad y de campo, así como relacionando los casos de humanos con manifestaciones de la enfermedad y el contacto de estos con los roedores portadores de la enfermedad como en el caso de los mineros (Ido et al., 1917). A partir de aquí comenzó un arduo interés en el reconocimiento y aislamiento del agente en casi todos los mamíferos, resaltando la importancia epidemiológica en los animales domésticos como potencial fuente de infección para el humano como en el caso del perro; serovariedad *Canicola* en Holanda en 1933 (Faine et al., 1999; Alston, 1958).

Wolff y Broom en 1954 fueron los primeros en agrupar las diferencias antigénicas que encontraban en las leptospiras en serotipos y serogrupos, así como la diferenciación en dos principales especies: *Leptospira icterohaemorrhagiae* para los especímenes patógenos y *Leptospira biflexa* para los no patógenos (Faine et al., 1999).

## 1.2 LEPTOSPIROSIS EN MÉXICO

En 1918, Hideyo Noguchi se encontraba trabajando en el Instituto Rockefeller y fue comisionado para estudiar un brote epidémico sugerente de fiebre amarilla, trasladándose al puerto de Guayaquil, Ecuador. Descubrió en la sangre de los enfermos una espiroqueta a la que denominó "*Leptospira icteroides*" (Faine et al., 1999; Alston, 1958).

En diciembre de 1919 se le notificó a Hideyo Noguchi, que había un brote de fiebre amarilla en Yucatán, México (comunidades de Kinchil y Tetiz). Con base en sus hallazgos durante su estancia en Ecuador, decidió venir a México trayendo consigo sueros hiperinmunes y vacunas. Llegó a Mérida el 23 de diciembre de 1919, poniendo a su disposición el laboratorio del Hospital O'Horán. A todos los enfermos les realizó frotis sanguíneos, pero sólo en un caso encontró el tipo de espiroqueta para él conocida, procediendo a la inoculación de medios de cultivo,

de los cuales obtuvo un aislado. Esto constituyó el primer caso de leptospirosis humana en México (Noguchi, 1920).

En 1937, Bustamante mencionó tres casos de la enfermedad de Weil en pescadores en Tampico, Tamaulipas; en este mismo estado, en 1938, Castañeda aisló leptospiras en ratas. En la década de los 50's, Varela y su grupo realizaron varios estudios acerca de leptospirosis, sobre todo en Veracruz, Tampico y en el Distrito Federal. En 1958, se reportó el primer brote epidémico en Yucatán. En el mismo año, Mendoza-Hernández observó 10% de aglutininas leptospirales en el suero de 91 pacientes con diagnóstico de hepatitis. Uno de los primeros estudios que evidenció seroprevalencia importante en México fue el realizado por Varela y Zavala en 1961, que mostró un porcentaje de 18% en 10,362 sueros estudiados procedentes de 21 estados de la República Mexicana. Por otro lado, en 1997, Colín-Ortiz y colaboradores, en un estudio realizado entre 1961 y 1995, con 9,875 sueros obtenidos en Yucatán, Valle de México y Distrito Federal, encontraron un promedio de 14.4% positivos. En 1991, Caballero y asociados encontraron 39% de seroprevalencia en trabajadores de granjas ganaderas y porcinas. En 1995, Gavaldón y su grupo analizaron 206 muestras de sueros de donadores de sangre por aglutinación microscópica (AM) contra siete serovares de *Leptospira interrogans*: 7% fueron positivos, de los cuales 53% reaccionaron con la serovariedad Shermani, 33% con Canicola, 20% con Pyrogens, 13% con Pomona y 6% con Icterohaemorrhagiae. En el 2006, Navarrete-Espinosa y colaboradores realizaron un estudio transversal en 500 habitantes de Jáltipan, Veracruz, mediante muestras sanguíneas, encontrando una seroprevalencia de 4%. En 2002, Vado-Solís y colaboradores realizaron un estudio clínico-epidemiológico en humanos y reservorios animales en el estado de Yucatán, a través del análisis serológico; encontrando 439 casos de probable leptospirosis y 1,060 reservorios (vacas, cerdos, perros, ratas y zarigüeyas); encontraron seroprevalencia de 14.2% en humanos. Las serovariedades predominantes en la población abierta fueron Tarassovi, Hardjo, Pomona y Panama. En 2011, Navarrete y asociados realizaron un estudio transversal prospectivo en 204 habitantes de Izamal, Yucatán; 88% fue positivo a la observación directa de sangre en campo oscuro, 87 y 50.5% fueron

positivos a la AM a títulos de 1:40 y 1:80, respectivamente. La serovariedad predominante fue Hardjo (94%) (García et al., 2013).

### 1.3 PATOGENIA

Las leptospiras penetran al organismo a través de abrasiones y heridas, piel reblandecida por humedad o por las mucosas bucal, nasal y conjuntival, transfusiones sanguíneas (Plank y Dean 2000). Una vez que se encuentra en el torrente sanguíneo se multiplica con rapidez durante 7-10 días (fase de leptospiremia) y posteriormente se disemina a todos los órganos (Prescott, 2008).

Los mecanismos por los que produce daño a los tejidos aun no están bien definidos, pero la respuesta inmune está implicada en la patogénesis de leptospirosis, con la formación de inmunocomplejos, liberación de citocinas y vasculitis autoinmune (Adler, 2015).

En humanos, los altos niveles de “leptospiremia” durante la infección presentan evidencia de una “tormenta de citocinas” con altas concentraciones de IL-6 y TNF-alfa, respuesta inmune que se ha visto en cuadros graves de sepsis (Sikkema et al., 2010).

Los hallazgos histopatológicos en los animales de laboratorio y en los seres humanos que han muerto por la infección por leptospirosis son muy similares a los de choque endotóxico (Adler, 2015).

El lipopolisacárido (LPS) de *Leptospira interrogans* estimula la adherencia de neutrófilos y la activación de plaquetas lo que puede ser responsable de las anomalías inflamatorias y de coagulación (Guo, 2015).

En caso de tratarse de un animal preñado, invaden al feto, donde producen alteraciones orgánicas similares a las de los adultos. Muchas veces se presenta anemia de tipo hemolítica, producida por la acción de hemolisinas bacterianas, la razón más aceptada para explicar el aborto son las lesiones endoteliales sistémicas, que también se presentan en los placentomas e impiden la transferencia de nutrientes y metabolitos entre la madre y el feto (Levett, 2001).

La iridociclitis o uveítis anterior de los equinos se debe a una reacción de hipersensibilidad de tipo II, debido a una relación antigénica que presentan estructuras internas de las diferentes serovariedades de leptospiras con la superficie de la córnea y el cristalino (Houwens et al., 2011).

El órgano diana de la infección por leptospirosis suele ser el hígado observando en los estudios histopatológicos sinusoides congestionados y necrosis (apoptosis de los hepatocitos).

Los cambios patológicos hallados en pulmones suelen ser hemorragias, infiltrado inflamatorio y alveolitis necrosante (Levett 2001). En riñón es común encontrar necrosis tubular y nefritis intersticial, con semiología de poliuria y hematuria. Después de permanecer un corto tiempo en el espacio intersticial, penetran en los túbulos contorneados proximales y aparece en la luz de éstos donde permanecen largos periodos de tiempo, siendo excretados en la orina de animales enfermos y sanos portadores (Abuauad et al., 2005; Barnett et al., 1999).

La serovariedad Canícola es reconocida como causante de daño renal, al provocar lesiones como nefritis, nefrosis o esclerosis renal destruyendo nefronas, ocasionando que muchos de los productos de desecho del metabolismo, como la urea y la creatinina se acumulen en proporción casi directa al número de nefronas destruidas, con una consecuente azotemia y uremia grave (Castro et al., 2001).

#### **1.4 SIGNOS CLÍNICOS**

La principal semiología, aunque no específica, suelen ser cuadros de fiebre, cefaleas, mialgia, tos no productiva, náusea, dolor abdominal, las alteraciones encontradas en estudios de laboratorio básicos tanto en biometría hemática, bioquímica sanguínea y urianálisis son inespecíficas a la infección pero consecuencia del daño a los principales órganos afectados (Adler, 2015).

La semiología de la leptospirosis canina puede ser desde inaparentes hasta severos casos que provoquen la muerte, relacionada con la edad e inmunidad del hospedero. En perros se han definido 4 presentaciones importantes de la

enfermedad; hemorrágica, icterica, urémica y abortiva, con variaciones en la evolución (Birnbaum et al., 1998; Major et al., 2014).

La presentación hemorrágica generalmente es aguda, se presenta principalmente en cachorros provocando pirexia, gastroenteritis hemorrágica, hematemesis, melena, hematoquezia, epistaxis, petequias en membranas mucosas. La forma icterica es de curso sub-agudo, las hemorragias son menos evidentes, pero la ictericia se aprecia fácilmente, tanto por el daño hepático como por la destrucción de los eritrocitos, provocando además cuadros de anemia.

El síndrome urémico es de curso agudo a sub-agudo y generalmente mortal, con signos de trastornos renales; poliuria, polidipsia, oliguria, hematuria, acompañado de polipnea y úlceras en tracto gastrointestinal, siendo más evidentes en la cavidad oral.

La presentación reproductiva se caracteriza por la presentación de abortos, mortinatos, nacimientos prematuros y cachorros débiles (Prescott et al., 2002).

En el ganado bovino, la leptospirosis produce pérdidas económicas de manera primaria por sus efectos sobre la reproducción, pudiendo aparecer mortinatos, abortos y/o nacimiento de animales débiles e infertilidad (Zacarías et al., 2008). La mayoría de las infecciones cursan de manera subclínica, observándose ictericia, hemoglobinuria, hematuria, evidencias de daño renal, meningitis e incluso mortalidad.

Las hembras preñadas pueden abortar debido a la pirexia mantenida y la producción láctea prácticamente desaparece. La presentación básicamente depende de la serovariedad involucrada siendo la más específica Hardjo-bovis y Hardjo-prajitno, aunque es común aislar Grippotyphosa, Pomona, Icterohaemorrhagiae y Autumnalis (Espí, 2000; Levett, 2001).

## **1.5 HAMSTER SIRIO**

El hámster es el biomodelo más usado para desarrollar investigaciones relacionadas con el proceso clínico, inmunológico y patológico de la infección con *Leptospira interrogans*, particularmente el hámster sirio o dorado (*Mesocricetus*

*auratus*), debido a la gran susceptibilidad que presenta ante este agente presentándose como una infección aguda letal produciendo la muerte en un periodo de 3-7 días dependiendo del grado de virulencia de la serovariedad inoculada (Van der Ingh et al., 1986; Coutinho et al., 2011; Barnett et al 1999).

En el presente trabajo se inoculó *Leptospira interrogans* en epitelio del abazón, siendo considerada esta la ruta más natural de infección; los abazones se usan en investigación ya que son estructuras con características inmunológicas únicas, esto debido a la pobre circulación linfática y a la carencia de tejido glandular (Claire, 2002).

La enfermedad clínica aguda se manifiesta principalmente por trastorno respiratorio, disnea, debilidad muscular, postración y en algunos casos se puede observar hemoptisis. También se pueden observar trastornos nerviosos asociados a meningitis como incoordinación e hiperestesia, generalmente unas horas antes de la muerte (Adler, 2015).

En el parénquima pulmonar, se observan hemorragias de leves a severas, infiltrado perivascular, neumonía intersticial, congestión y coagulación intravascular diseminada (CID). En riñones, se observa nefritis intersticial, hemorragias en grado variable, degeneración tubular y necrosis. Si los animales llegan a sobrevivir más días se puede observar fibrosis severa con pérdida de la anatomía renal, cursando con hematuria y falla renal.

En el hígado se observa degeneración hidrópica e infiltrado linfoplasmocitario, congestión y hemorragias en grado variable (Claire, 2002; Adler, 2015).

## **1.6 DIAGNOSTICO**

Un buen diagnostico es la premisa para un adecuado tratamiento tanto en animales como en humanos, así mismo lo ideal es no confiar en una sola prueba diagnóstica, ya que debido a las características antigénicas y de sobrevivencia en el organismo podríamos tener, por ejemplo, cuadros de enfermedad con falta de evidencia en el diagnostico si solamente recurrimos a una de las muchas pruebas

específicas que existen actualmente, aunado a esto, las alteraciones encontradas en hemogramas, bioquímicas sanguíneas y urianálisis son inespecíficas y solo dan información complementaria asociada a los signos clínicos de enfermedad.

Este es uno de los retos a los que el MVZ debe enfrentarse al tratar de llegar a un diagnóstico óptimo, tanto en leptospirosis como en otras enfermedades infecciosas y no infecciosas, lo que implica un costo considerable para el propietario de los animales, sean de compañía o de producción, que en algunas ocasiones no se encuentra en condiciones económicas o simplemente no desea gastar ese dinero.

Se deben obtener muestras de suero, orina y según el caso, tejidos. La confirmación de la enfermedad se realiza a través de la prueba de aglutinación microscópica (AM). Ésta es la técnica de referencia internacional para la detección de anticuerpos específicos anti-leptospira, considerando positivos a partir de títulos 1:100, la sensibilidad como la especificidad de la prueba de aglutinación son muy altas, sin embargo, la prueba no hace distinción entre títulos de anticuerpos post-vacunales o por infección, así mismo pueden presentarse reacciones cruzadas entre serovariedades. De tal manera que después de un esquema de tratamiento, se recomienda dejar pasar al menos dos semanas para realizar de nueva cuenta la prueba referida. La técnica de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) identifica anticuerpos IgM e IgG, esta prueba se recomienda para distinguir entre infección natural e inmunidad inducida por vacunación, brinda un diagnóstico definitivo, casi sin error, tiene un costo elevado y no siempre está disponible comercialmente.

La prueba a través de PCR (Polymerase Chain Reaction) se realiza a partir de orina, sangre o tejidos y demuestra la presencia del microorganismo a través de la identificación del ADN de la bacteria. Es aún más cara y todavía más difícil de encontrar un laboratorio que cuente con el equipo (Langston et al., 2003; Wagner et al., 2008; Gaschen, 2008).

## 1.7 TRATAMIENTO

En la actualidad los tratamientos antibacterianos utilizados contra la infección por leptospirosis confieren algunas desventajas en cuanto al manejo hacia los animales (tratamientos prolongados, intervalos de dosificación muy cortos, gastritis, destrucción de microorganismos saprofitos en tracto gastrointestinal), así mismo no garantizan la cura clínica y/o bacteriológica.

Los antibióticos antimicrobianos más comúnmente usados para el tratamiento contra leptospirosis son los  $\beta$ -lactámicos naturales (penicilina, ampicilina, amoxicilina) y sintéticos (cefalexina, ceftriaxona, cefalotina) tetraciclina, doxiciclina y eritromicina (Katz et al., 2001).

En perros los tratamientos con  $\beta$ -lactámicos naturales o sintéticos requieren intervalos de dosificación cortos, cada 4, 6, 8 o 12 horas según el fármaco, los más utilizados son; ampicilina 40 mg/kg cada 4 horas, amoxicilina 30 mg/kg cada 8 horas y cefalexina 15 mg/kg cada 12 horas, así mismo lo ideal para garantizar la cura clínica y bacteriológica serían tratamientos largos durante 1 mes por lo menos, lo que dificulta el manejo del paciente ya además de que el propietario no aceptara un protocolo de inyecciones diario, resultaría muy molesto y doloroso para el paciente.

Los  $\beta$ -lactámicos que se puedan administrar por la vía oral tienden a generar cuadros de gastritis severa, incluso manejando protectores de la mucosa gástrica, o problemas de diarrea por súper infecciones relacionadas a modificación de la microbiota intestinal. Estas desventajas son aún mayores para la doxiciclina (usada a razón de 5 a 10 mg/kg cada 12 a 24 horas), la cual por vía intramuscular o subcutánea necrosa el sitio de administración, por vía oral induce gastritis irritativa desde la primera dosis y la vía más utilizada es la EV, en la cual puede provocar flebitis incluso a partir de la primera administración (Suepaul et al., 2015; Greene, 2014).

En el caso del ganado, tanto el diagnóstico como tratamiento, la mayoría de las veces no tienen una supervisión por parte de un médico veterinario, los ganaderos

optan por comprar preparados comerciales recomendados por un laboratorio o proveedor, en donde podemos encontrar mezclas de penicilina (antibiótico tiempo dependiente) con eritromicina (antibiótico concentración dependiente) en donde las dosis y tiempos de dosificación recomendados no benefician a ninguno, teniendo así pobre o nula respuesta al tratamiento, sin mencionar la puerta abierta a resistencias bacterianas (Gerritsen et al., 1993).

La enrofloxacin no es considerada un antibacteriano de elecci3n para el tratamiento de leptospirosis en medicina veterinaria (Nelson y Couto, 2013; Greene, 2014). Para lograr un efecto 3ptimo contra leptospirosis, requiere lograr concentraciones superiores a 4 µg/mL en sangre (o tejido blanco) con la cual lograr un PK/PD ideal garantizando una cura cl3nica y sobre todo bacteriol3gica, concentraci3n que no se logra superar con las dosis y v3as de administraci3n recomendadas por los productos comerciales de enrofloxacin actuales en el mercado, a3n el preparado original no logra superar tal concentraci3n s3rica (Kim, 2006; Murray y Hospenthal, 2004).

## **1.8 FLUOROQUINOLONAS**

Las quinolonas y fluoroquinolonas son una de las familias de antibacterianos m3s utilizadas, desde 1960 en que Leshner puso a disposici3n de la comunidad m3dica al 3cido nalid3xico, primera quinolona antibacteriana que fue r3pidamente aceptada para la terap3utica de las infecciones de v3as urinarias en humanos. A la fecha se han sintetizado m3s de 10,000 compuestos diferentes a partir del anillo b3sico de las quinolonas y actualmente se distinguen 4 generaciones con potencia antibacteriana y caracter3sticas farmacol3gicas mejoradas. Los compuestos de 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> generaci3n poseen un espectro bastante amplio y mejor distribuci3n, por lo que se les utiliza en infecciones agudas y cr3nicas de dif3cil manejo (Sumano y Ocampo, 2006).

Muchas fluoroquinolonas han sido utilizadas ampliamente en medicina veterinaria, como la flumequina, danofloxacin, difloxacin, marbofloxacin, norfloxacin y sarafloxacin. Sin embargo, el f3rmaco que revolucion3 la terap3utica de

enfermedades bacterianas en medicina veterinaria fue y sigue siendo, la enrofloxacin, desarrollada en los años 80's para uso exclusivo en medicina veterinaria (Sumano y Ocampo, 2006).

## **1.9 ENROFLOXACINA**

La enrofloxacin (ácido 1-ciclopropil-7-(4-etil-1-piperazinil)-6-fluor-1,4-dihidro-4-oxo-3-quinolincarboxílico) es un agente antibacteriano sintético perteneciente al grupo de las fluoroquinolonas de tercera generación de uso exclusivo en medicina veterinaria (Kim, 2006).

La enrofloxacin es una de las fluoroquinolonas más estudiadas en medicina veterinaria. Ha sido administrada a través de la vía oral y parenteral en dosis de 2 hasta 15 mg/kg de peso corporal en prácticamente todas las especies (Sumano y Ocampo, 2006).

## **1.10 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LA ENROFLOXACINA**

La enrofloxacin puede encontrarse en 4 isoformas: 1- catión ácido; 2- neutro no ionizado; 3- zwitterion intermedio y 4- ión básico, todos ellos dependiendo del pH al que se encuentren, a pH ácido, el grupo piperazinil y el grupo el carboxilo se encuentran protonados a pH básico. La fracción disociada corresponde al ácido carboxílico. La máxima solubilidad para la enrofloxacin se logra a un pH de 5.02 y el mayor porcentaje de transferencia de fase acuosa a fase orgánica se encuentra a un pH de 7.00. Cuando el pH del medio está cercano a la neutralidad se favorece el ingreso de enrofloxacin a las bacterias en forma de zwitterion a través de canales de porinas hidrofílicas, mientras que al encontrarse en pH's ácidos se encuentra en forma ionizada y no puede entrar a la bacteria por difusión ni por los canales de porinas (Otero, 2001; Mckellar, 1996).

Se inactivan poco en presencia de suero y otros fluidos orgánicos, actúan independientemente del tamaño del inóculo y pueden ejercer efecto antibacteriano a nivel intracelular. Penetra y alcanza concentraciones intracelulares muy

elevadas tanto en las células fagocíticas como en las no fagocíticas (Mckellar, 1996).

### **1.11 MECANISMO DE ACCIÓN**

Actúa fundamentalmente en la inhibición de la síntesis de ADN bacteriano, provocada por el bloqueo de la subunidad A de la ADN girasa (topoisomerasa II) enzima perteneciente al grupo de las topoisomerasas, las cuales en número de cuatro, son esenciales para la duplicación del ADN (Sumano y Ocampo, 2006).

Además de la inhibición de la topoisomerasa II existe inhibición de la topoisomerasa IV, encargada de separar la parte replicada del ADN. El bloqueo de esta última tiene su mayor importancia en las bacterias Gram positivas. Al ser inhibidas las topoisomerasas y quedar sin reparación porciones dañadas (Otero, 2001).

Se ha observado, que las mutaciones que afectan a la subunidad B de la ADN-girasa, también inducen modificaciones en la sensibilidad bacteriana a las fluoroquinolonas, y por tanto, parecería que las fluoroquinolonas podrían afectar no sólo a la subunidad A, sino también a la subunidad B.

Además de bloquear la síntesis de ADN, la presencia de cortes no unidos en las ramas del ADN como consecuencia de la inhibición del resellado de las hebras de ADN por acción de las quinolonas, actúa como señal de inducción del sistema "SOS" de reparación del mismo, formándose endonucleasas capaces de destruir al ADN, hecho que explicaría el mecanismo de acción bactericida de estos compuestos (Vancutsem et al., 2006).

Las fluoroquinolonas causan una rápida muerte de las bacterias, con una tasa y magnitud que aumenta a medida que aumenta su concentración, hasta que alcanza un máximo ("concentración bactericida máxima") (Otero, 2001).

Se han propuesto tres vías de entrada por parte de las fluoroquinolonas a las bacterias; hidrofílica por canales o porinas, hidrofóbica a través de la membrana fosfolipídica por un proceso activo y mediante un proceso de difusión pasiva por el

gradiente de concentración. Las dos primeras rutas involucran la hidrofobicidad y la tercera involucra el desplazamiento de cationes divalentes en la membrana de lipopolisacáridos de las bacterias (Brown, 1996).

## **1.12 FARMACOCINÉTICA DE LA ENROFLOXACINA**

La enrofloxacin presenta una biodisponibilidad (F) oral relativamente alta en casi todas las especies estudiadas, registrándose valores de 50-75 %, aunque este valor es bastante inferior en los rumiantes, no superando el 10 % (Bregante, 1999); en terneros lactantes, al igual que ocurre con las especies que poseen estómago monocavitario, es mayor del 80%. A pesar de ello, para los rumiantes lactantes se recomienda la vía parenteral ya que los minerales presentes en los lácteos pueden producir la quelación del antimicrobiano (Bregante, 2000). En équidos, donde otras fluoroquinolonas no han demostrado buena absorción por vía oral la enrofloxacin tiene una biodisponibilidad de aproximadamente el 60 %. No se han encontrado diferencias significativas en la biodisponibilidad oral de la enrofloxacin en cerdos en ayunas con respecto a los que habían ingerido alimento (Bregante, 1999). El tiempo que tarda en alcanzarse la máxima concentración (Tmax) es muy variable en todas las especies. Esta variabilidad se aprecia incluso dentro de las aves y de los herbívoros. La biodisponibilidad (F) parenteral de la enrofloxacin es prácticamente completa en todas las especies estudiadas alcanzando el pico de concentración plasmática entre 1 y 2 horas post-administración. Quizás la vía más utilizada ha sido siempre la vía intramuscular, sin embargo los últimos estudios demuestran que la vía subcutánea presenta también una elevada biodisponibilidad (Bregante, 2000).

La biodisponibilidad (F) parenteral para roedores se encuentra alrededor del 60 %. En la mayoría de las especies animales el volumen de distribución de la enrofloxacin es elevado. Se alcanzan altas concentraciones en saliva y secreción nasal, en mucosa, epitelio y secreción bronquial así como en el hígado y en el tracto urinario. Penetran bien en el tejido pulmonar, fluido de revestimiento y

macrófagos alveolares. La enrofloxacin llega con rapidez a la glándula mamaria (Aramayona et al., 1994).

La enrofloxacin llega a todos los órganos y tejidos en bovinos, porcinos, perros, gatos, pollos y pavos, siendo la pauta de distribución muy similar en todas las especies estudiadas, con elevadas concentraciones. La enrofloxacin presenta una tasa de unión a proteínas cercana al 20 % en caballos y pollos, al 30 % en perros, gatos, pavos y cerdos, al 50 % en vacas, en roedores y conejos alrededor del 70 % (Bregante, 1999,2000).

El volumen de distribución en roedores se encuentra entre 5 y 10 L/kg a una dosis subcutánea de 10 mg/kg (Aramayona et al., 1996).

En vacas, tras la administración intravenosa de enrofloxacin, el pico de concentración en leche se alcanzó entre 0,7 horas y 1,3 horas, mientras que para su metabolito; la ciprofloxacina, este pico apareció después (5-8 horas). En conejas, la relación leche/plasma de la enrofloxacin y la ciprofloxacina, medida como AUC leche/AUC plasma fue de 2.59 y 3.61, respectivamente (Aramayona et al., 1994,1996).

La enrofloxacin se metaboliza parcialmente a ciprofloxacina, la cual es responsable en algunas especies de una considerable parte de la actividad antimicrobiana (Vancutsem, 2006).

El metabolismo se lleva a cabo en el hígado, y posiblemente en otros sitios como la ubre o los macrófagos. El efecto de primer paso hepático es bajo (Vancutsem, 2006).

En perros, se encontraron concentraciones de enrofloxacin en bilis y orina 10-20 veces mayores que las concentraciones registradas en plasma (Kun, 1993).

Los datos de los que se dispone indican que el aclaramiento plasmático se sitúa entre 0,5 y 1 L/kg/ h en la mayoría de las especies no observándose diferencias significativas según la vía de administración, ni la dosis administrada (Vancutsem, 2006).

En roedores, a dosis de 10 mg/kg se encontraron los siguientes valores para: semi vida de eliminación ( $t_{1/2\lambda}$ ) 1.4-1.8 horas, aclaramiento plasmático (Cl) 1.2-4 L/kg\*hora y tiempo medio de residencia (MRT) 1.1-1.3 horas (Bregante, 1999).

### **1.13 RELACION FARMACOCINÉTICA / FARMACODINAMIA (PK/PD) DE LA ENROFLOXACINA**

En la actualidad la racionalidad del uso de los antibacterianos ha establecido una relación PK/PD para un uso correcto de los antibacterianos, para lo cual se ha dividido a los antibacterianos en los dependientes de la estancia (tiempo dependiente) y los dependientes de la concentración.

En los antibacterianos tiempo dependientes “la destrucción bacteriana dependiente del tiempo de exposición del agente patógeno al antibacteriano”, la saturación de la tasa de destrucción ocurre durante el tiempo en el cual su concentración supera a la CMI ( $T > CMI$  = debajo de la CMI o alrededor de 2 a 5 veces la CMI) y no depende de la concentración máxima alcanzada. Se ha demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* que las concentraciones sobre estos valores no destruyen a los microorganismos ni más rápido ni más extensamente, entre los antibacterianos tiempo dependientes se encuentran  $\beta$ -lactámicos, macrólidos, tetraciclinas, etc. Para estos antibacterianos la eficacia clínica está directamente relacionada a CMI ( $T > CMI$ ), si el tiempo por encima o igual a la CMI es mayor al 40 a 50% del intervalo entre dosis se puede tener hasta un 60% de eficacia clínica y bacteriológica y si la  $T > CMI$  es de es de 60 a 70% del intervalo entre dosis se puede dar de un 80 a 90% de eficacia clínica y bacteriológica (Sumano y Ocampo, 2006).

En contraste los antimicrobianos dependientes de la concentración alcanzan su máxima eficacia clínica cuando las concentraciones pico o  $C_{MAX}$  son por lo menos 8-10 veces el valor de la CMI para los aminoglucósidos y de 10 a 12 veces para las fluoroquinolonas. ). A mayor concentración del antibacteriano mayor tasa y extensión de la actividad (aminoglucósidos, fluoroquinolonas y exposición de bacterias anaerobias a metronidazol). En el caso de las fluoroquinolonas,

adicionalmente se ha asignado que la relación del área de la concentración plasmática sobre la curva (AUC), dividido entre la CMI del patógeno en cuestión debe generar un factor superior o igual a 125 ( $AUC/CMI \geq 125$ ) (Sumano y Ocampo, 2006).

#### **1.14 ENROFLOXACINA RE CRISTALIZADA**

En la actualidad, además del desarrollo de nuevos compuestos antibacterianos, la manipulación farmacéutica ha permitido optimizar el mecanismo de acción de los antibacterianos ya existentes mediante técnicas como la re-cristalización.

El polimorfismo se define como la habilidad que posee una sustancia de existir en varias formas cristalinas con una diferente disposición espacial de las moléculas que forman el cristal (Savjani et al., 2012).

Por el momento se encuentra en auge el rediseño farmacéutico de moléculas que han existido en el mercado por muchos años, se han generado nuevas formulaciones que permiten incluso una liberación controlada o sostenida mediante la manipulación de vehículos. De la misma manera, la industria farmacéutica de la salud animal es pionera en la aplicación de tecnología de fármacos de liberación modificada, ingeniería y biotecnología para el desarrollo de productos (Blagden et al., 2007; Kawakami, 2012; Knapman, 2000).

El nuevo preparado fue diseñado y desarrollado previamente a este estudio en el departamento de Fisiología y Farmacología de la FMVZ UNAM, número de patente 472715 (Instituto Mexicano de la Protección Industrial).

En estudios previos (Gutiérrez et al. 2015) se ha demostrado en aves un aumento de las características farmacológicas en relación al producto de referencia de 3 a 5 veces. No se ha encontrado una toxicidad diferente a la de la ER en estudios de toxicidad sub-crónica y aguda (Sumano y Gutiérrez, 2013).

## 2.-JUSTIFICACIÓN

En estudios previos en aves (Gutiérrez et al., 2015) y rumiantes (Sumano-Gutiérrez, 2013) se ha demostrado que la biodisponibilidad de la nueva forma recristalizada de enrofloxacin (EC) es superior a las presentaciones existentes comerciales a la misma dosis y vía de administración, y si se considera que la enrofloxacin no se utiliza en infecciones por leptospirosis dado que no logra concentraciones adecuadas a la dosis utilizada, la cual ha sido reportada como  $< 4 \mu\text{g/mL}$  en sangre y órganos blanco, es justificable el suponer que esta nueva forma de enrofloxacin logre alcanzar los niveles requeridos tanto en sangre como en tejidos para poder ser una nueva opción terapéutica en procesos infecciosos causados por *Leptospira interrogans*.

### **3.-HIPÓTESIS**

Sí la nueva forma re-cristalizada de enrofloxacin presenta una mayor biodisponibilidad que las presentaciones comerciales existentes, entonces presentará eficacia clínica contra procesos de infección por *Leptospira interrogans* inducidos experimentalmente en hámsteres sirios (*Mesocricetus auratus*).

## **4.- OBJETIVOS**

### **FASE I**

Realizar un estudio farmacocinético comparativo de la nueva forma re-cristalizada de enrofloxacin (EC) y la enrofloxacin de referencia Baytril Bayer® (ER) en hámster sirio (*Mesocricetus auratus*) a dosis de 10 mg/kg, por vía subcutánea.

Realizar un estudio de concentraciones tisulares de la nueva forma re-cristalizada de enrofloxacin (EC) y la enrofloxacin de referencia Baytril Bayer® (ER) en hámster sirio (*Mesocricetus auratus*) a dosis de 10 mg/kg, por vía subcutánea, analizando las concentraciones alcanzadas en corazón, pulmón, hígado, riñón, intestino delgado, intestino grueso, piel, musculo estriado y grasa.

### **FASE II**

Realizar una evaluación de morbilidad-mortalidad con hámsteres tratados con la nueva forma re-cristalizada de enrofloxacin (EC) y compararla con el producto original Baytril® Bayer (ER), mediante la inoculación vía intramucosa de los abazones con la cepa virulenta LOCaS46 (3,981 leptospiras /mL) de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola, se realizaron evaluaciones serológicas (aglutinación microscópica), cultivo para verificar la infección y microscopia de campo oscuro, así como estudios histopatológicos y de PCR, para constatar la eficacia clínica de los tratamientos administrados.

## **5.-MATERIAL Y METODOS**

La fase analítica se realizó en el laboratorio del departamento de fisiología y farmacología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, ubicada en Ciudad Universitaria. La fase experimental se realizó en el laboratorio de microbiología de la Unidad de Servicio de Diagnóstico y Constatación (USEDICO) del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en el Altiplano (CEIEPAA) de la FMVZ UNAM.

Los animales fueron mantenidos bajo condiciones de aislamiento en el bioterio de USEDICO, bajo las especificaciones de cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-2001), alojados en jaulas individuales, con alimento y agua a libre acceso en condiciones de temperatura de 22°C y 40% de humedad, con periodos controlados artificialmente de luz/obscuridad de 12 horas.

### **5.1 FASE I. FARMACOCINÉTICA (SUERO Y TEJIDO)**

#### **5.1.1 FARMACOCINÉTICA EN SUERO**

De acuerdo con los postulados del principio de las “3R” en cuanto a la experimentación con animales; de ser posible reemplazar a los animales de experimentación por otros métodos que no impliquen su uso, reducir el número de estos en cuanto sea necesario y refinar las técnicas para aminorar el sufrimiento (Russell-Burch, 1959), se utilizó la técnica denominada Pool Sampling (Lavrakas , 2008) de tal forma que para obtener 3 sangrados de 9 horarios (1,2,4,8,12,24,48,60 y 84 horas) se utilizaron 15 hámsteres adultos por cada preparado de enrofloxacin, en lugar de 27, alternando los tiempos de sangrado como se muestra en el **cuadro 1**, considerando que cada animal no fue puncionado para obtención de muestra de sangre más de dos veces.

**Cuadro 1.- Modelo de obtención de muestras de sangre de los hámsteres por medio de un muestreo tipo “Pool Sampling”.**

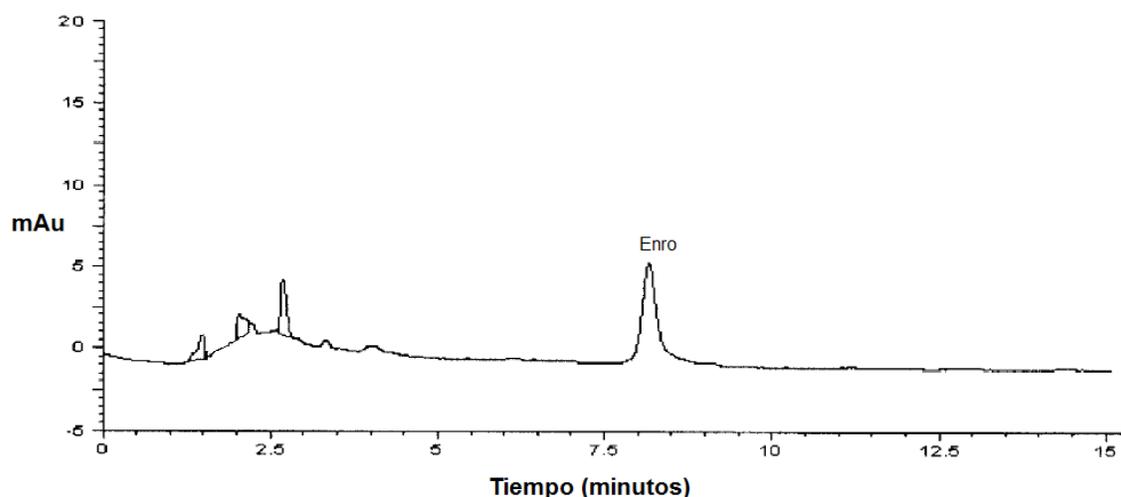
Horas									
1	2	4	8	12	24	48	60	84	
Hámster muestreado									
1	4	7	10	13	1	2	3	4	
2	5	8	11	14	5	6	7	8	
3	6	9	12	15	9	10	11	12	

Se obtuvo en cada muestreo entre 1 y 2 ml de sangre en tubo vacutainer sin heparina (**figura 1**) Se centrifugaron las muestras a 3000 RPM durante 15 minutos, y se separó el suero. Cada muestra se identificó y congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis que fue realizado dentro de los primeros 5 días posteriores a la toma de la muestra.



**Figura 1.- Pesaje de los animales para una dosificación precisa de la enrofloxacina para cada grupo, la primera muestra de sangre se obtuvo bajo los efectos anestésicos de isofluorano, la segunda y última muestra se obtuvo inmediatamente después a la sobredosis del anestésico inhalado.**

Las concentraciones séricas se determinaron mediante el método cromatográfico propuesto por Elmas *et al*, (2002) con un sistema Jasco XLC HPLC con una columna simétrica C18 (4.6 mm × 100 mm, 3.5 µm; Waters), y una pre columna C18 (4.6 mm × 20 mm, Waters) con un detector de fluorescencia. La técnica cromatográfica fue establecida y validada confirmando que el procedimiento analítico proporciona un grado aceptable de linealidad, sensibilidad y precisión al momento de las lecturas de suero con enrofloxacin. La linealidad se demostró con las medias del coeficiente de variación intra-ensayo (<1.9) y el error intra-ensayo (< 1.6). El ensayo analítico fue lineal de 0.010 a 60 µg/mL, la concentración lineal entre el área del pico y la concentración evaluada fue confirmada mediante el análisis de regresión lineal  $y = 8369696.11x + 25776.06$ ,  $r^2 = 0.9994$  y el intervalo de confianza 8248463.48 a 8490928.74. Promedio ± 1 SD la recuperación fue de  $94 \pm 2\%$  ( $r = 0.97$ ). El límite de detección fue de 0.01µg/mL, y el de cuantificación de 0.005 µg/mL. El test de robustez y tolerancia indica una diferencia absoluta de 1.54 y un coeficiente de variación de 1.2 % y < 2.0 %, respectivamente (**figura 2**).



**Figura 2.- Cromatograma modelo de la técnica analítica.**

Se utilizó el programa PKAnalyst (MicroMath®, Saint Louis, Missouri USA) para evaluar las curvas farmacocinéticas eligiendo el mejor modelo ( $r \geq 0.99$ ) para cada grupo utilizando una suma de cuadrados y criterio mínimo de Akaike's. El Modelo 3 fue el que ajustó más a al grupo EC, siendo su fórmula general:

$$\text{Concentration (Time)} = \frac{\text{Dose} \bullet K_{AB}}{\text{Volume } K_{AB} - K_{elim}} e^{-K_{elim} \cdot \text{Time}} - e^{-K_{AB} \cdot \text{Time}}$$

Las variables obtenidas fueron: AUC = área de la concentración plasmática sobre la curva;  $AUMC_{0-\infty}$  = área bajo la curva en el primer momento de 0 a  $\infty$  con extrapolación de la fase terminal; MRT = tiempo medio de residencia;  $T_{1/2\beta}$  = vida media de eliminación;  $C_{MAX}$  = máxima concentración plasmática,  $T_{MAX}$  = tiempo al que se alcanza la  $C_{MAX}$ .

Para ER el modelo fue el 13:

$$\text{Concentration (Time)} = Ae^{-\alpha \cdot \text{Time}} + Be^{-\beta \cdot \text{Time}} + Ce^{-K_{AB} \cdot \text{Time}}$$

Las variables obtenidas son las mismas que el modelo anterior. La biodisponibilidad relativa se obtuvo conforme a la siguiente fórmula:

$$\text{Biodisponibilidad relativa (F}_R\text{)} = \text{AUC}_{ER} / \text{AUC}_{EC} \times 100$$

Las diferencias estadísticas en las variables farmacocinéticas por grupo se evaluaron mediante Kruskal-Wallis y Dunn-test., las variables de probabilidad  $P < 0.05$  fueron consideradas como significativas. Las evaluaciones estadísticas se realizaron con el programa "Statistical Package for the Social Sciences" (SPSS) Windows, Versión 14.0.

### 5.1.2 FARMACOCINÉTICA EN TEJIDOS

60 hámsteres sirios adultos (30 hembras/30 machos), sanos y libres de patógenos específicos, fueron pesados para administrar vía subcutánea una dosis de 10 mg/kg de cada uno de los preparados de enrofloxacin a evaluar (30 hámsteres con enrofloxacin re-cristalizada y 30 hámsteres con Baytril® Bayer) (**Cuadro 2**).

**Cuadro 2.- Número de animales y hora post inoculo del antibiótico a la cual se les aplico eutanasia.**

TIEMPO	Grupo	
	ER	EC
4 HORAS	6	6
12 HORAS	6	6
24 HORAS	6	6
48 HORAS	6	6
72 HORAS	6	6

Se les aplico eutanasia (a las 4, 12, 24, 48 y 72 horas, en grupos de 6 hámsteres cada uno) mediante sobredosis de anestesia inhalada (isoflurano), y así obtener 1 gramo de los siguientes tejidos: corazón, pulmón, hígado, riñón, intestino delgado (duodeno), intestino grueso (ciego), musculo estriado (semitendinoso y semimembranoso), grasa y piel, los cuales fueron macerados (**figura 3**), se les adiciono 1 ml de agua desionizada para ser posteriormente centrifugados a 3000 RPM durante 30 minutos, y se separo el sobrenadante. Cada muestra se identifico y congelo a -20°C hasta su análisis que fue realizado dentro de los primeros 5 días posteriores.



**Figura 3.- Obtención de los órganos después del método eutanásico mediante sobredosis de anestesia inhalada, para el posterior pesaje y macerado de cada tejido.**

Las concentraciones en tejidos se determinaron mediante el método cromatográfico propuesto por Elmas *et al*, (2002) con un sistema Jasco XLC HPLC con una columna simétrica C18 (4.6 mm × 100 mm, 3.5 µm; Waters), y una pre columna C18 (4.6 mm × 20 mm, Waters) con un detector de fluorescencia. La técnica cromatográfica fue establecida y validada confirmando que el procedimiento analítico proporciona un grado aceptable de linealidad, sensibilidad y precisión al momento de las lecturas. La linealidad se demostró con las medias del coeficiente de variación intra-ensayo (<1.9) y el error intra-ensayo (< 1.6). El ensayo analítico fue lineal de 0.010 a 60 µg/mL, la concentración lineal entre el área del pico y la concentración evaluada fue confirmada mediante el análisis de regresión lineal  $y = 8369696.11x + 25776.06$ ,  $r^2 = 0.9994$  y el intervalo de confianza 8248463.48 a 8490928.74. Promedio ± 1 SD la recuperación fue de  $94 \pm 2\%$  ( $r = 0.97$ ). El límite de detección fue de 0.01µg/mL, y el de cuantificación de 0.005 µg/mL. El test de robustez y tolerancia indica una diferencia absoluta de 1.54 y un coeficiente de variación de 1.2 % y < 2.0 %, respectivamente.

Las diferencias estadísticas en las concentraciones de los tejidos por tiempo por grupo se evaluaron mediante Kruskal-Wallis y Dunn-test., las variables de probabilidad  $P < 0.05$  fueron consideradas como significativas. Las evaluaciones estadísticas se realizaron con el programa “Statistical Package for the Social Sciences” (SPSS) Windows, Version 14.0.

## 5.2 FASE II. DESAFIO

De los 52 hámsteres sirios de 8 semanas de edad utilizados en esta fase, (**cuadro 3**), 46 hámsteres fueron inoculados vía intramucosa de los abazones a una concentración de 3,981 leptospiras/mL de la cepa virulenta LOCaS46 serovariedad Canicola de *Leptospira interrogans* (**figura 4**).



**Figura 4.-** Previa inducción mediante anestesia inhalada (isofluorano), se inoculo un volumen total de 0.1 mL vía intramucosa de los abazones.

**Cuadro 3.-** Grupos y subgrupos; fueron inoculados con la cepa virulenta de leptospira excepto el grupo control negativo, que únicamente recibió el tratamiento (3 animales para cada enrofloxacina).

GRUPO	TRATAMIENTO	INICIO TRATAMIENTO	DURACIÓN TRATAMIENTO	# ANIMALES
CONTROL +	AGUA INYECTABLE	24 horas	7 días	4
CONTROL -	ENRO-C/BAYTRIL	24 horas	7 días	6
TESTIGO	SIN TRATAMIENTO	_____	_____	6
BAYTRIL 24	BAYTRIL	24 horas	7 días	6
BAYTRIL 48	BAYTRIL	48 horas	7 días	6
BAYTRIL 72	BAYTRIL	72 horas	7 días	6
ENRO-C 24	ENRO-C	24 horas	7 días	6
ENRO-C 48	ENRO-C	48 horas	7 días	6
ENRO-C 72	ENRO-C	72 horas	7 días	6

El tratamiento con EC y ER fue administrado a una dosis de 10 mg/kg vía subcutánea cada 24 horas durante 7 días.

Diariamente se monitoreo peso y temperatura (**figura 5**) en todos los hámsteres hasta el día de la muerte por infección, o bien eutanasia al día 28 post inoculo mediante sobredosis de anestesia inhalada (isofluorano).



**Figura 5.- Mediante báscula y termómetro digital fue posible llevar un registro diario de los hámsteres durante el estudio.**

### **5.2.1 NECROPSIA E HISTOPATOLOGÍA**

Se realizó necropsia de todos los animales (tanto los muertos por enfermedad como a los que se les aplicó eutanasia), describiendo las lesiones encontradas y documentando mediante fotografía, así mismo se obtuvo muestras de los tejidos conservándolos en formol al 10% para ser cortados y fijados en laminillas para evaluación histopatológica (**figura 6**), lo cual se realizó en el laboratorio de histopatología de USEDICO, CEIEPAA, UNAM, la Dra. Irma Eugenia Candanosa Aranda fue la encargada de verificar las lesiones reportadas en los órganos.



**Figura 6.- Órganos de hámsteres muertos por enfermedad, previamente fijados en formol al 10 % para ser cortados y procesados en el Histokinette Leica instruments®.**

### **5.2.2 MICROSCOPIA DE CAMPO OSCURO**

Se realizo inmediatamente después de la obtención de los órganos durante la necropsia, a partir de los macerados de tejido renal diluyendo en una gota de medio EMJH líquido colocada en un portaobjetos para su observación al microscopio de campo oscuro y así identificar la presencia de leptospiras.

### **5.2.3 CULTIVO BACTERIOLÓGICO**

El aislamiento de leptospiras a partir de las muestras se realizo del macerado de tejido renal de los hámsteres inoculados, se depositaron 2 gotas directamente en los medios de cultivo (STUART, EMJH y FLETCHER). Los cultivos primarios y diluciones se incubaron en estufa bacteriológica a 30 °C revisando periódicamente (cada 15, 30, 60 y 90 días) al microscopio de campo oscuro con la finalidad de detectar el desarrollo de los microorganismos.

### **5.2.4 AGLUTINACIÓN MICROSCOPICA**

La prueba se realizo en dos fases:

- a) Prueba tamiz que se utilizo para detectar los positivos.
- b) Extensión de las diluciones en aquellos sueros positivos para titulación de anticuerpos.

Mediante la muestra de sangre obtenida de los animales, se centrifugo y se obtuvo el suero, para así realizar una dilución 1:10 del mismo para prueba tamiz y dilución 1:25 para extensión de las diluciones.

### **5.2.5 METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE TEJIDOS**

Las muestras obtenidas de riñón de los hámsteres fueron procesadas para la extracción de ADN con el sistema comercial QIAGEN (QIAamp DNA Mini Kit®) siguiendo el protocolo de extracción del fabricante.

Posteriormente en el laboratorio de inmunología de la Universidad Autónoma de Querétaro campus Aeropuerto, la concentración y pureza de ADN fueron evaluadas en el NANODROP 2000 THERMO SCIENTIFIC®.

### **5.2.6 PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA)**

La técnica de PCR se empleo como complemento a la detección de leptospiras patógenas en las muestras de tejido renal de los hámsteres inoculados y tratados.

Se realizaron PCR punto final con los extractos de ADN a partir de tejido renal de los 4 hámsteres control positivo así como los 36 hámsteres inoculados y tratados con EC y ER respectivamente.

Se utilizaron los iniciadores MILL2509f y MILL2510r que amplifican fragmentos de ADN de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola, de 203 PB del gen LipL32 (**figura 7**).

## LipL32, secuencia del gen

```
GAAAAAATTTTCGATTTTGGCTATCTCCGTTGCACTCTTTGCAAGCATTACCGCTTGTGGTGCCTTCGGT  
GGTCTGCCAAGCCTTAAAAGCTCTTTTGTCTGAGCGAGAGCACAGTTCCGGGAACAAACGAAACCGTAA  
AAACGTTCCCTTCCCTATGGATCTGTGATCAACTATTACGGATACTGTAAGCCAGGACAAGCGCCGGACGG  
CTTAGTCGACGGAAACAAAAAGCATACTATCTCTATGTTTGGATTCCAGCTGTAATCGCTGAAATGGGA  
GTTCGTATGATTTCCCAACAGGCGAAATCGGTGAACCAGGCGAGAGATTTAGTAAGTGATGCGTTCA  
AAGCGGCAACCCAGAAAGAAAAATCAATGCCACATTGGTTTGATACTTGGATCCGTGTTGAAAGAATGTC  
GGCAATTATGCCGACCAATCGCTAAAGCAGCGAAAGCGAAACCGGTTCAAAAATGGACGATGACGAT  
GATGGTGATGATACTTATAAGGAAGAGAGACACAACAATACTCTTACTAGAATCAAGATCCCTA  
ATCCTCCAAAATCTTTTACGATCTGAAAAACATCGATACTAAAAAACTTTTAGTAAGAGGTCTTTACAG  
AATTTCTTTCACTACTTACAACCGGGTGAAGTGAAAGGATCTTTCGTTGCATCTGTTGGTCTGCTTTTC  
CCACCAGGTATTCCAGGTGTGAGCCCGCTGATTCACCTCAAATCCTGAGGAACTGCAAAAACAAGCTATCG  
CTGCTGAAGAGTCTTTGAAAAAGCCG
```

**Figura 7.- Secuencia de los iniciadores utilizados y su posición en el genoma de LipL32 de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola.**

Los iniciadores fueron sintetizados en la unidad de síntesis de oligonucleótidos y secuenciación del instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 FASE I. FARMACOCINÉTICA (SUERO Y TEJIDOS)

Los hámsteres no mostraron incomodidad y/o inflamación en el sitio de inyección y/o reacciones adversas con la única dosis de antibiótico previo a la toma de muestras de sangre.

En el **cuadro 4** se resumen las medias  $\pm$  1DE de las variables farmacocinéticas obtenidas. Todas las diferencias de los parámetros farmacocinéticos fueron estadísticamente significativos ( $P < 0.05$ ). Los valores de  $C_{MAX}$  en el grupo EC fueron 6.7 veces superiores a los del grupo ER ( $17.3 \pm 4.5 \mu\text{g/mL}$  vs  $2.6 \pm 0.7 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente). Así mismo, los valores de  $AUC_{0-\infty}$  de EC fueron 23 veces superiores a los de ER ( $459.2 \pm 2.87 \mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$  vs  $19.9 \pm 1.08 \mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$ ). Resultando esto en una biodisponibilidad para EC de 2307%, al ser comparada

con ER. El tiempo medio de estancia para ER fue de  $5.6 \pm 0.8$  h mientras que para EC de  $37.3 \pm 2.2$  h.

En la **figura 8** se muestran las curvas de concentración vs tiempo para los dos grupos.

Al comparar las concentraciones tisulares de los dos grupos se encontró una mayor estancia y concentración en los tejidos tratados con EC, en las **figuras 9,10 y 11** se muestran las concentraciones en los tejidos analizados para los 2 grupos, en donde se observa que EC además de lograr concentraciones más altas en todos los tejidos, también presenta un tiempo de permanencia (MRT) mayor que ER. En los **cuadros 5-13** se muestran las concentraciones medias  $\pm$  1DE en tejidos para los 2 grupos EC y ER, con diferencias estadísticamente significativas  $P < 0.05$ , hasta donde las concentraciones en tiempo para ER fue posible medir y comparar con EC ya que para este último fue posible encontrar concentraciones hasta 72 horas post-inyección de la única dosis del antibiótico a 10 mg/kg vía subcutánea.

**Cuadro 4.- Variables farmacocinéticas en suero de los 2 grupos (ER y EC) después de una aplicación parenteral a dosis de 10 mg/kg.**

PARAMETRO	GRUPO		Valor de P
	EC	ER	
<b>C<sub>MAX1</sub>(µg/mL)</b>	$17.3 \pm 4.5^a$	$2.6 \pm 0.7^b$	0.0001
<b>C<sub>MAX2</sub> (µg/mL)</b>	$6.5 \pm 1.1$	-	0.00001
<b>T<sub>MAX1</sub> (h)</b>	$8.2 \pm 0.7^a$	$2.8 \pm 0.2^b$	0.0001
<b>T<sub>MAX2</sub> (h)</b>	$48 \pm 1.8$	-	0.00001
<b>T<sub>1/2β1</sub> (h)</b>	$7.0 \pm 0.2$	$1.9 \pm 0.2^b$	0.0001
<b>T<sub>1/2β2</sub> (h)</b>	$6.6 \pm 0.2$	-	0.00001
<b>AUC<sub>0-∞</sub> (µg/mL·h)</b>	$459.2 \pm 44.7^a$	$19.9 \pm 1.7^b$	0.0001
<b>AUMC (µg/mL·h<sup>2</sup>)</b>	$17123.1 \pm 403.5^a$	$111.0 \pm 10.3^b$	0.0001
<b>MRT (h)</b>	$37.3 \pm 2.2^a$	$5.6 \pm 0.8^b$	0.0001
<b>FR (%)</b>	2307	-	

Diferentes literales entre columnas representan diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ )

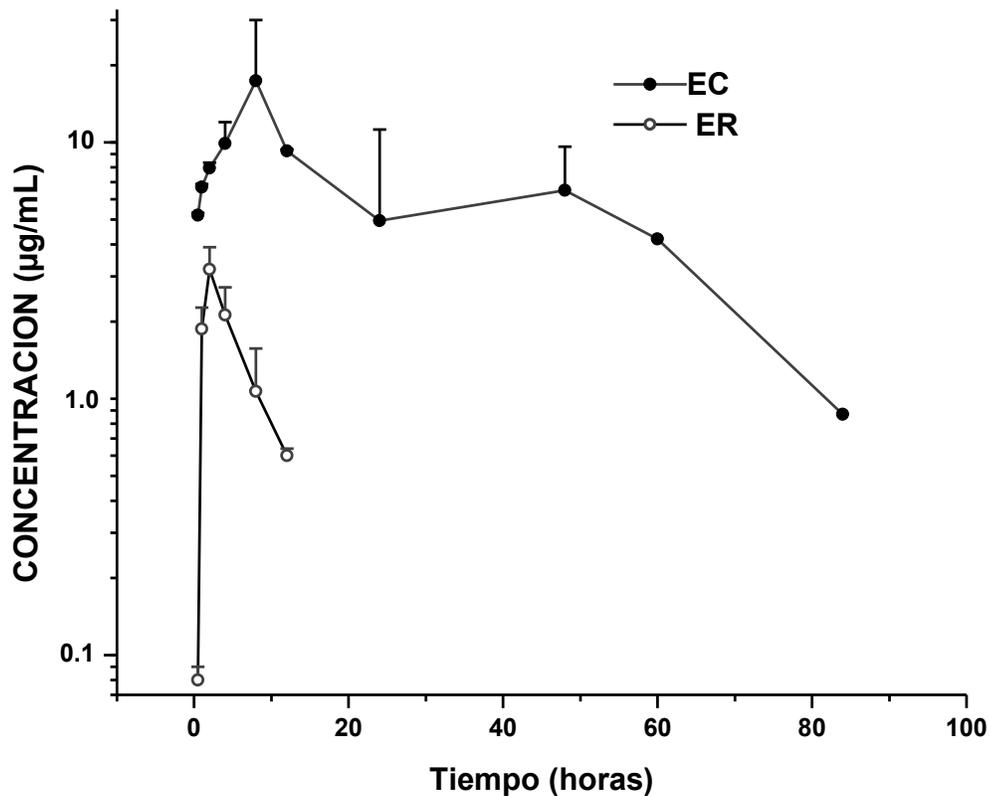


Figura 8. Concentraciones séricas de ambos preparados de enrofloxacin en hámster sirio (*Mesocricetus auratus*) tras la administración parenteral (subcutánea) a razón de 10 mg/kg.

Cuadro 5. Concentraciones pulmonares de los 2 grupos evaluados con enrofloxacin a dosis de 10 mg/kg

TIEMPO	ENRO- C		BAYTRIL	
	PROM	DE	PROM	DE
4	13.5 <sup>a</sup>	1.1	9.1 <sup>b</sup>	1.4
12	68.3 <sup>a</sup>	5.6	3.5 <sup>b</sup>	0.8
24	4.05 <sup>a</sup>	1.3	0.07 <sup>b</sup>	0.06
48	14.1 <sup>a</sup>	4.2	0	0
72	0.24 <sup>a</sup>	0.1	0	0

Diferentes literales entre columnas representan diferencias estadísticas P < 0.05

**Cuadro 6. Concentraciones hepáticas de los 2 grupos evaluados con enrofloxacin a dosis de 10 mg/kg**

TIEMPO	ENRO- C		BAYTRIL	
	PROM	DE	PROM	DE
4	25 <sup>a</sup>	4.23	4.3 <sup>b</sup>	0.75
12	93.3 <sup>a</sup>	10.2	2.9 <sup>b</sup>	0.8
24	3.5 <sup>a</sup>	0.3	0.9 <sup>b</sup>	0.07
48	8.1 <sup>a</sup>	2.4	0	0
72	0.08	0.04	0	0

Diferentes literales entre columnas representan diferencias estadísticas P< 0.05

**Cuadro 7. Concentraciones renales de los 2 grupos evaluados con enrofloxacin a dosis de 10 mg/kg**

TIEMPO	ENRO- C		BAYTRIL	
	PROM	DE	PROM	DE
4	95 <sup>a</sup>	8.7	11.1 <sup>b</sup>	1.2
12	23 <sup>a</sup>	3.7	5.1 <sup>b</sup>	1.1
24	4.3 <sup>a</sup>	0.9	1.3 <sup>b</sup>	0.8
48	5.4 <sup>a</sup>	1.04	0.05 <sup>b</sup>	0.01
72	0.07 <sup>a</sup>	0.05	0	0

Diferentes literales entre columnas representan diferencias estadísticas P< 0.05

**Cuadro 8. Concentraciones en duodeno de los 2 grupos evaluados con enrofloxacin a dosis de 10 mg/kg**

TIEMPO	ENRO- C		BAYTRIL	
	PROM	DE	PROM	DE
4	113 <sup>a</sup>	11.2	16.2 <sup>b</sup>	3
12	55.8 <sup>a</sup>	9.4	6.3 <sup>b</sup>	0.8
24	20.2 <sup>a</sup>	3	0.4 <sup>b</sup>	0.05
48	28 <sup>a</sup>	3.1	0	
72	3.4 <sup>a</sup>	1.2	0	0

Diferentes literales entre columnas representan diferencias estadísticas P< 0.05

**Cuadro 9. Concentraciones en ciego de los 2 grupos evaluados con enrofloxacin a dosis de 10 mg/kg**

TIEMPO	ENRO- C		BAYTRIL	
	PROM	DE	PROM	DE
4	69.5 <sup>a</sup>	11	6.8 <sup>b</sup>	1.4
12	225.5 <sup>a</sup>	24.2	6.2 <sup>b</sup>	2.1
24	75.3 <sup>a</sup>	12.1	0.8 <sup>b</sup>	0.1
48	6.2 <sup>a</sup>	1	0	0
72	0.7 <sup>a</sup>	0.2	0	0

Diferentes literales entre columnas representan diferencias estadísticas P< 0.05

**Cuadro 10. Concentraciones en corazón de los 2 grupos evaluados con enrofloxacin a dosis de 10 mg/kg**

TIEMPO	ENRO- C		BAYTRIL	
	PROM	DE	PROM	DE
4	4.3 <sup>a</sup>	1.5	5.3 <sup>a</sup>	1.2
12	28.1 <sup>a</sup>	10.8	2.1 <sup>b</sup>	0.8
24	4.1	1.1	0	0
48	13.6 <sup>a</sup>	5.6	0	0
72	0	0	0	0

Diferentes literales entre columnas representan diferencias estadísticas P< 0.05

**Cuadro 11. Concentraciones en piel de los 2 grupos evaluados con enrofloxacin a dosis de 10 mg/kg**

TIEMPO	ENRO- C		BAYTRIL	
	PROM	DE	PROM	DE
4	3.2 <sup>a</sup>	0.8	8.7 <sup>b</sup>	1.6
12	35.1 <sup>a</sup>	11.2	2.4 <sup>b</sup>	0.1
24	6.5 <sup>a</sup>	1.1	0.8 <sup>b</sup>	0.07
48	0	0	0	0
72	0	0	0	0

Diferentes literales entre columnas representan diferencias estadísticas P< 0.05

**Cuadro 12. Concentraciones en grasa de los 2 grupos evaluados con enrofloxacin a dosis de 10 mg/kg**

TIEMPO	ENRO- C		BAYTRIL	
	PROM	DE	PROM	DE
4	4.4 <sup>a</sup>	0.4	1.3 <sup>b</sup>	0.8
12	13 <sup>a</sup>	1.3	0.1 <sup>b</sup>	0.07
24	0	0	0	0
48	0	0	0	0
72	0	0	0	0

Diferentes literales entre columnas representan diferencias estadísticas  $P < 0.05$

**Cuadro 13. Concentraciones en musculo de los 2 grupos evaluados con enrofloxacin a dosis de 10 mg/kg**

TIEMPO	ENRO- C		BAYTRIL	
	PROM	DE	PROM	DE
4	1.9 <sup>a</sup>	0.9	5.3 <sup>b</sup>	1.2
12	2.5 <sup>a</sup>	0.8	2.1 <sup>a</sup>	0.8
24	0	0	0	0
48	0	0	0	0
72	0	0	0	0

Diferentes literales entre columnas representan diferencias estadísticas  $P < 0.05$

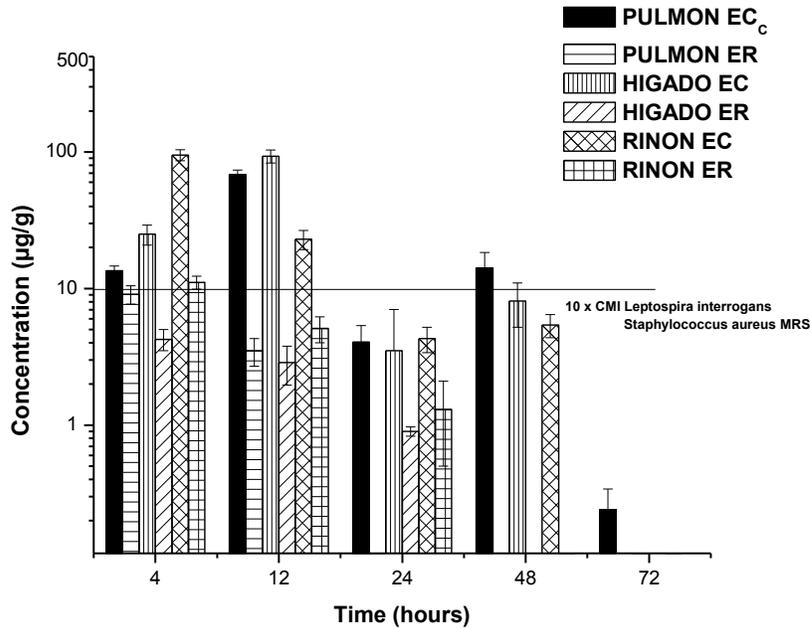


Figura 9.- Concentraciones en pulmón, hígado y riñón, tras una sola dosis parenteral 10 mg/kg (subcutáneo) de cada una de las enrofloxacinas (ER y EC) en hámster sirio (*Mesocricetus auratus*).

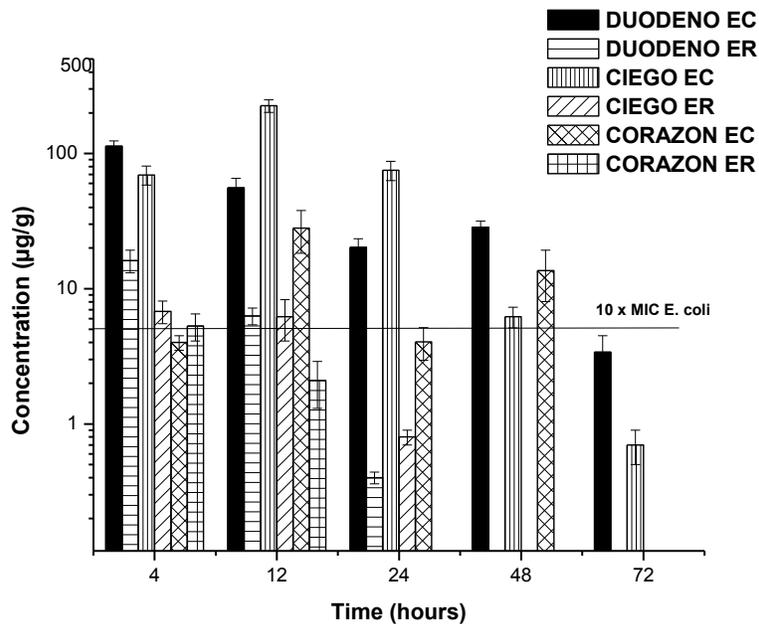
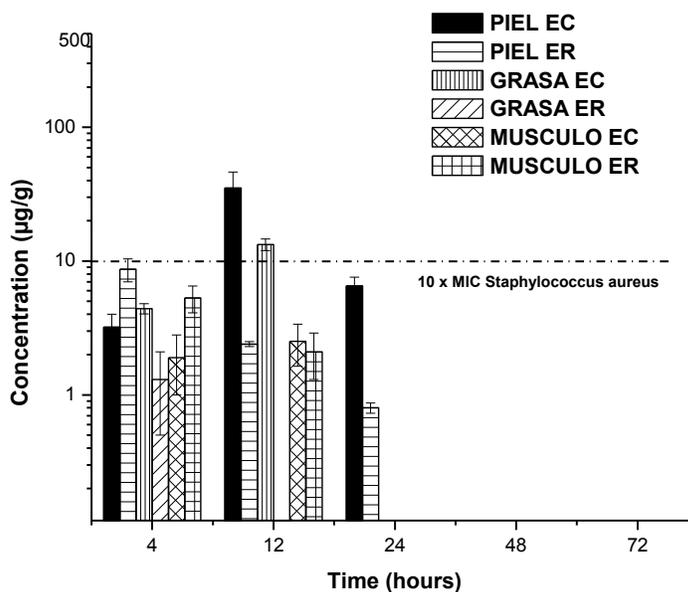


Figura 10.- Concentraciones en corazón, duodeno y ciego, tras una sola dosis parenteral 10 mg/kg (subcutáneo) de cada una de las enrofloxacinas (ER y EC) en hámster sirio (*Mesocricetus auratus*).

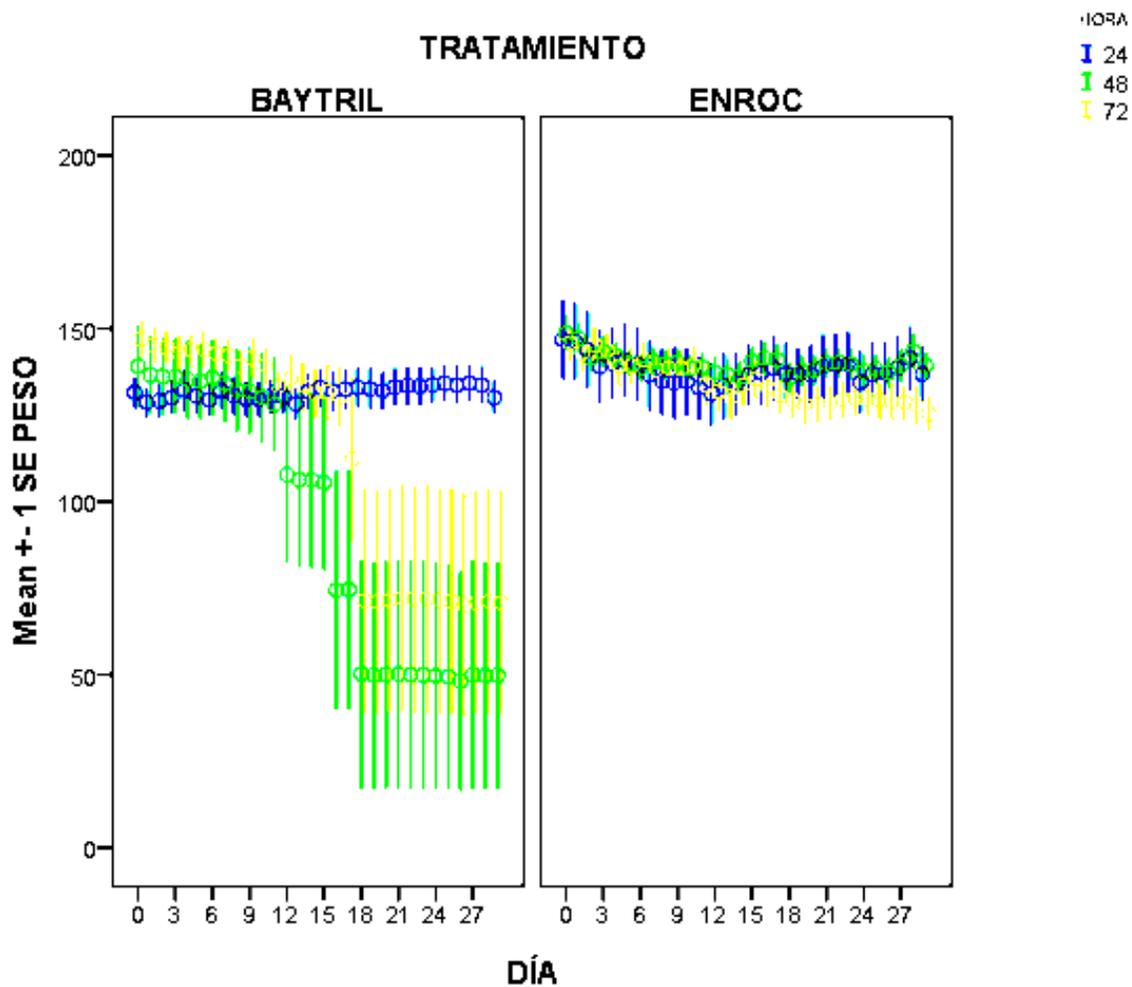


**Figura 11.- Concentraciones en piel, grasa y músculo estriado tras una sola dosis parenteral 10 mg/kg (subcutáneo) de cada una de las enrofloxacinas (ER y EC) en hámster sirio (*Mesocricetus auratus*).**

## 6.2 FASE II. DESAFIO

A todos los animales inoculados se les realizaron mediciones de peso y temperatura todos los días, desde el día cero (día de la inoculación de la cepa virulenta de leptospira), hasta el día de la muerte por enfermedad o el día de la eutanasia.

Fue posible observar durante el análisis estadístico ( $P < 0.05$ ) que la tendencia de pérdida de peso fue mayor en el grupo tratado con ER, como consecuencia del proceso infeccioso, de manera más evidente en los subgrupos en los que se inicio tratamiento a las 48 y 72 horas (horarios en los que para el grupo ER hubo muertes durante el transcurso de los 28 días), lo que resalta la importancia acerca de la premura del inicio de tratamiento en casos clínicos inclusive sin una semiología evidente (**figura 12**).



**Figura 12. Comportamiento de peso de cada uno de los hámsteres para los dos grupos durante los 28 días que se evaluó el proceso de infección.**

Para el monitoreo de la temperatura la tendencia de los animales del grupo ER, particularmente los que iniciaron tratamiento 48 y 72 horas post infección muestra hipotermia hacia los últimos días del estudio ( $P < 0.05$ ) (**figura 13**) lo que se correlaciona con la pérdida de peso debido al proceso infeccioso, son claros indicadores del evidente comportamiento que cada grupo presento durante el periodo de evaluación.

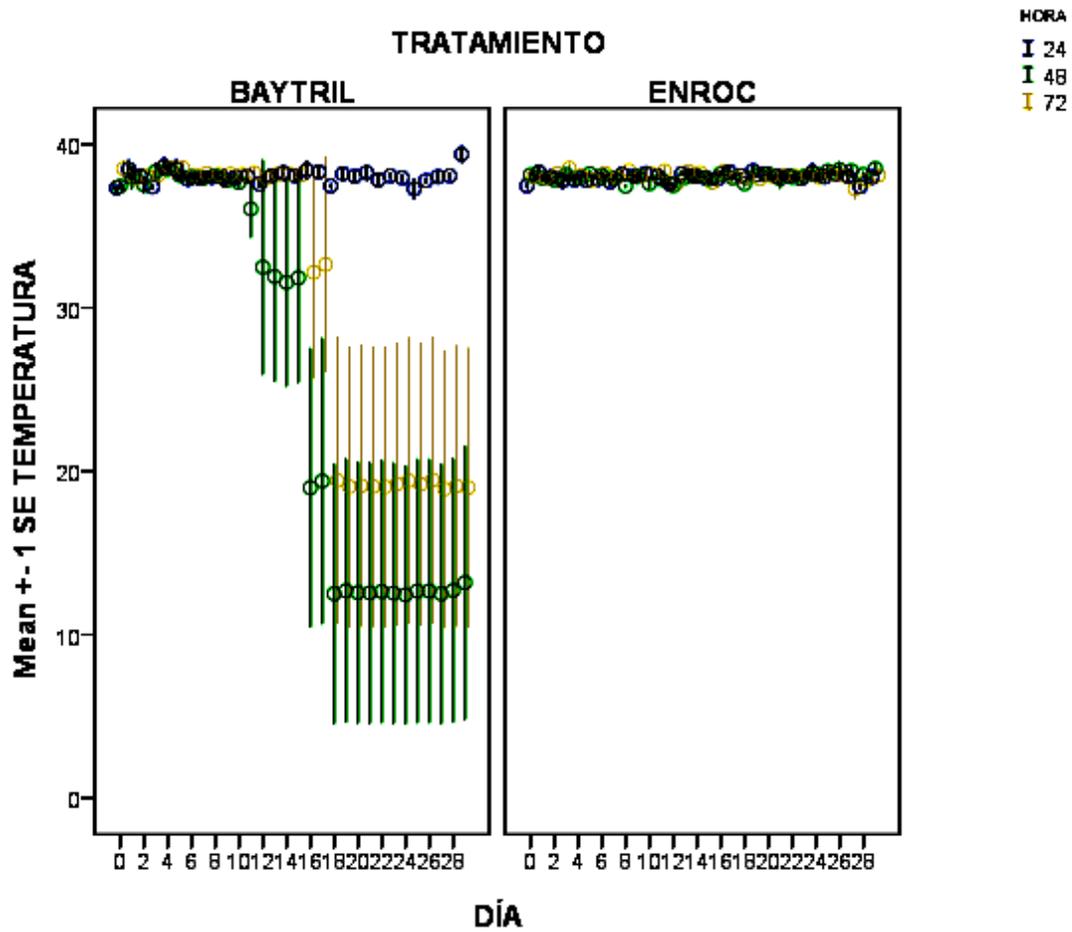


Figura 13.- Temperatura corporal de los hámsteres para los dos grupos, EC y ER durante los 28 días de evaluación

### 6.2.1 NECROPSIA E HISTOPATOLOGÍA

Los 4 animales grupo control inoculados con la cepa virulenta LOCaS46 de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola, no tratados, murieron al día 8 post infección (**figura 14**).



**Figura 14-** Se muestran los 4 animales controles positivos muertos por enfermedad al día 8 post-inoculo.

Durante el desarrollo del estudio estos animales presentaron pérdidas de peso mayores al 10 % entre el día cero (día del inoculo) y el día ocho (día de la muerte por enfermedad), la enfermedad comenzó a manifestarse entre el día 3 y día 5, los animales presentaron; hipoactividad, pelo hirsuto debido a que dejaron de acicalarse, postración, hiporexia, anorexia, poliuria, polidipsia, hematoquezia, hematuria, epistaxis, dos de ellos nistagmos y convulsiones.

Las principales lesiones macroscópicas y microscópicas encontradas, se describen en el **cuadro 14**.

**Cuadro 14.- Principales lesiones macroscópicas y microscópicas en los 4 animales del grupo control positivos muertos al octavo día post infección.**

<b>LESIONES MACROSCOPICAS</b>	<b>LESIONES MICROSCOPICAS</b>
Petequias pulmonares moderadas a graves y congestión perivascular	Hemorragia pleural moderada difusa, alveolos colapsados, disminución del espacio aéreo, infiltrado celular inflamatorio en alveolos moderado difuso.
Derrame pleural grave	Eritrocitos y células inflamatorias en espacio pleural
Hígado con bordes redondeados, zonas pálidas graves	Necrosis e infarto de hepatocitos, degeneración vacuolar, infiltrado linfocítico y plasmocítico. Hepatocitos binucleados y degeneración grasa.
Riñones hemorrágicos	Nefritis intersticial, hemorragia glomerular, necrosis tubular, degeneración vacuolar graves
Esplenomegalia moderada	Necrosis moderada a grave
Enteritis moderada	Edema y hemorragia moderada a grave

Para los seis hámsteres controles negativos que no fueron inoculados, así como los hámsteres inoculados con el microorganismo patógeno pero a los que se les aplicó eutanasia a las 24, 48 y 72 horas respectivamente, no se encontraron lesiones en los tejidos revisados y analizados.

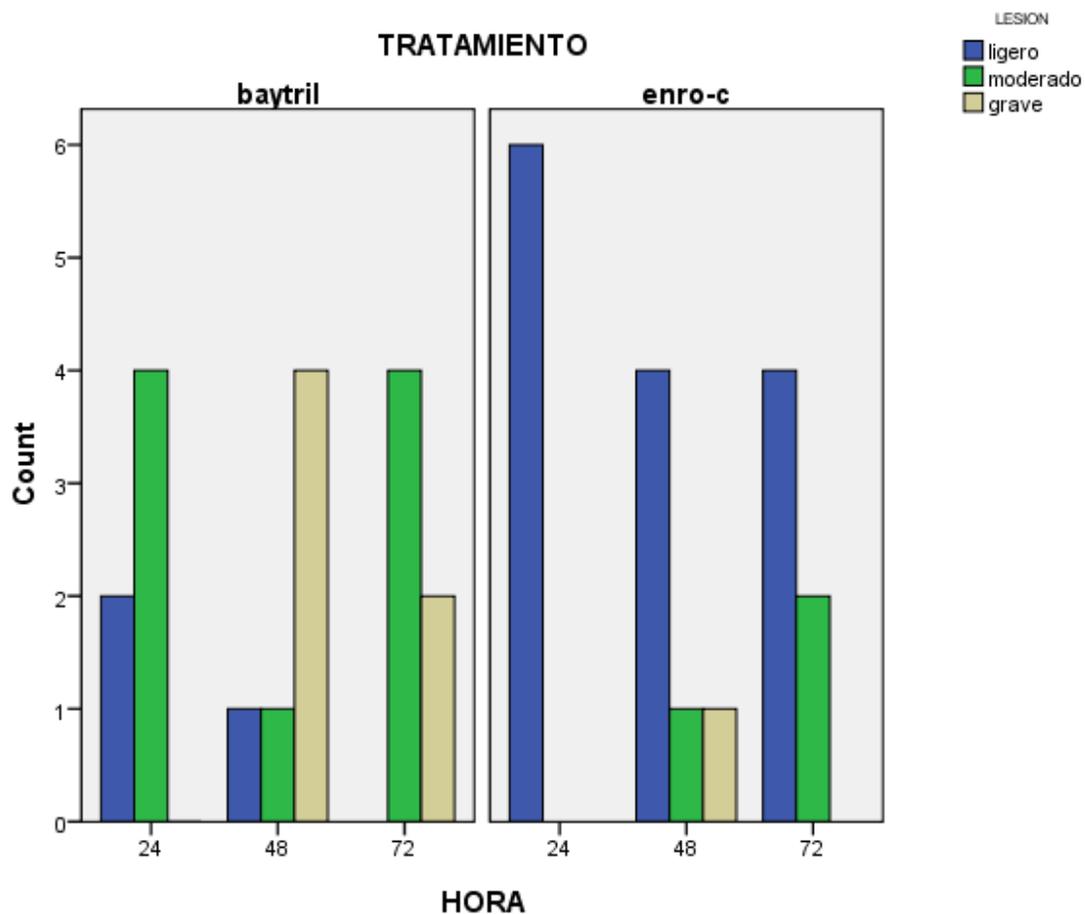
Para el grupo de animales tratados con ER (Baytril), siete animales murieron como consecuencia de la enfermedad durante el transcurso del estudio (**cuadro 15**), para el grupo de animales tratados con EC (enrofloxacina re-cristalizada) no se presentaron muertes a consecuencia de la enfermedad.

La comparación del grado de lesión durante el estudio histopatológico para ambos grupos, fueron clasificadas en 1(lesiones ligeras), 2 (lesiones moderadas) y 3 (lesiones graves) (**figura 15**).

Mediante el modelo de regresión logística binaria con un intervalo de confianza de entre 0.877 y 8.444 se pudo determinar que los hámsteres tratados con ER mostraron 2.718 veces más riesgo de presentar lesiones a consecuencia de la infección por leptospirosis que los hámsteres tratados con EC ( $P < 0.05$ ).

**Cuadro 15.- Identificación de los hámsteres del grupo tratado con Baytril (ER) y día de la muerte.**

IDENTIFICACIÓN	DÍA DE MUERTE
HAMSTER 2 48 HORAS	18
HAMSTER 4 48 HORAS	12
HAMSTER 5 48 HORAS	16
HAMSTER 6 48 HORAS	16
HAMSTER 1 72 HORAS	17
HAMSTER 2 72 HORAS	18
HAMSTER 5 72 HORAS	18



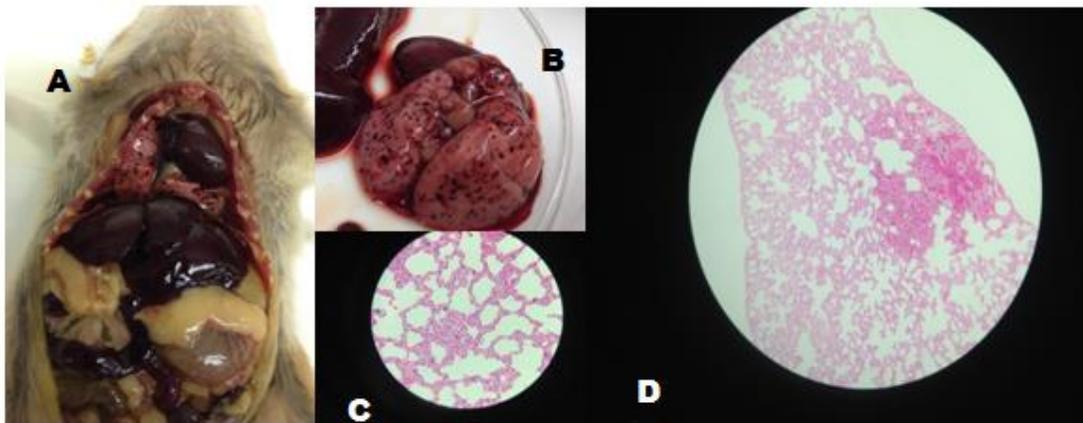
**Figura 15.- Comparación del grado de lesiones después del análisis histopatológico de cada uno de los hámsteres para cada grupo.**

El grupo ER presento un mayor número de individuos con evidencia de alteraciones inflamatorias y vasculares en los órganos como consecuencia de la infección por leptospirosis.

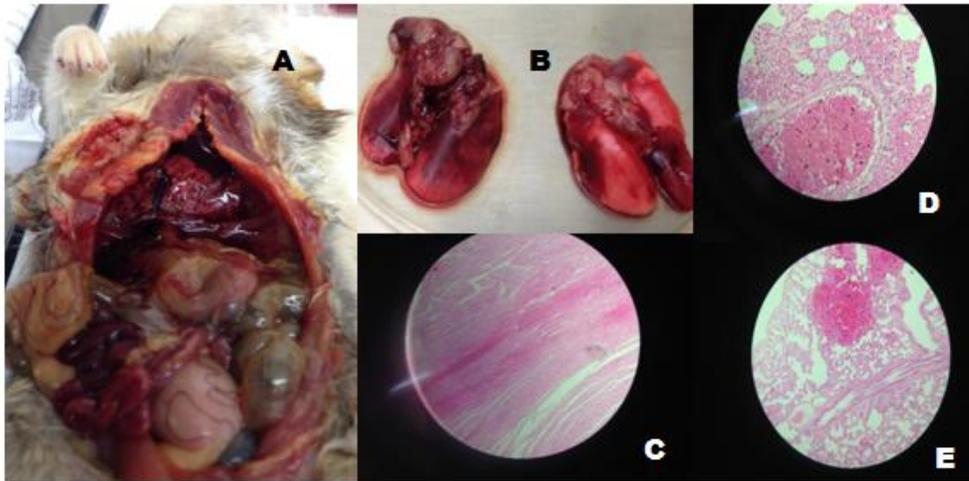
En la necropsia del hámster H2ER (48horas), se apreciaron hemorragias multifocales graves en parénquima pulmonar de ambos hemitórax, al corte histológico del pulmón se aprecio reducción moderada del espacio aéreo, congestión alveolar y zonas de trombosis (**figura 16**). En la necropsia de los hámsteres H1EC y H5EC (72horas), al cual se les aplico eutanasia mediante sobredosis de anestesia inhalada, a diferencia de los que murieron a consecuencia de la infección, se observaron los pulmones congestionados en la porción dorsal como consecuencia de muerte aguda , así mismo microscópicamente se muestra la disminución del espacio aéreo como consecuencia de la hipoxia, así como el estancamiento de eritrocitos en vasos sanguíneos , el daño observado en musculo cardiaco se asocia a consecuencia de la punción por aguja hipodérmica para la obtención de sangre (**figura 17**). En la necropsia del hámster H4ER (48 horas), macroscópicamente se apreciaron bordes redondeados en el hígado, la poca grasa que aun se apreciaba alrededor de los órganos se observaba con ictericia, en el corte histológico de tejido hepático se observo marmoleo del tejido lo que corresponde a zonas de necrosis, en el corte de tejido hepático se observo degeneración vacuolar moderada, hepatocitos binucleados por defecto en la mitosis; común en infecciones, así mismo se encontraron cuerpos de inclusión intracitoplasmocíticos (común en infecciones virales) , en corte de tejido hepático se encontraron zonas de hepatocitos sin núcleos (necrosis de los hepatocitos) (**figura 18**).

En la necropsia del hámster H6ER (48 horas) se aprecio ictericia en la grasa alrededor de los órganos, así como esplenomegalia, en los cortes histológicos del bazo se aprecio un aumento de eritrocitos en el parénquima así como zonas de necrosis (**figura 19**).En la necropsia del hámster H1ER (72 horas) se aprecio ictericia en la grasa alrededor de los órganos y enteritis hemorrágica en un 70 % del intestino delgado (**figura 20**). En la necropsia del hámster H2ER (72 horas) se

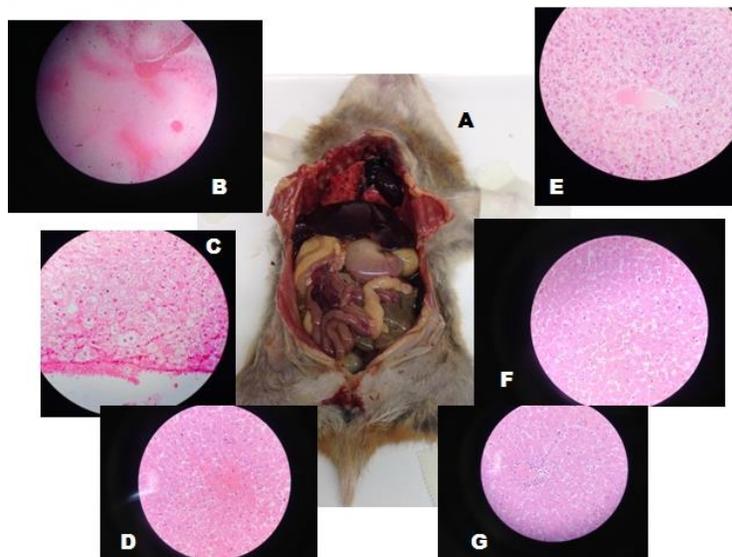
aprecio ictericia en la grasa, vejiga plétora que contenía orina con sangre, al corte histológico del riñón derecho se aprecia degeneración vacuolar moderada con zonas de necrosis glomerular de moderada a grave, en los cortes histológicos del riñón izquierdo se aprecia congestión y hemorragia de moderado a grave, así como infiltrado por macrófagos y leucocitos entre los túbulos renales (**figura 21**), principales lesiones encontradas a nivel renal, órgano que resulto ser el más afectado. Al comparar las lesiones microscópicas renales entre un animal tratado con EC y uno tratado con ER, las diferencias son de resaltar los cambios vasculares e inflamatorios (**figura 22**).



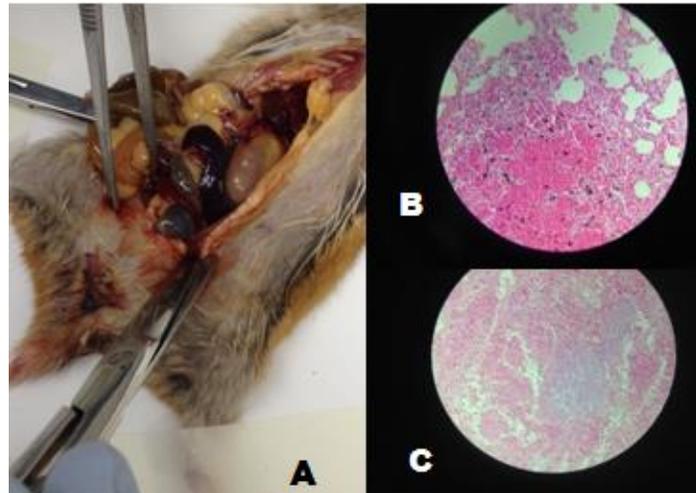
**Figura 16.- Lesiones macroscópicas y microscópicas en parénquima pulmonar.**



**Figura 17.- Lesiones vasculares en pulmón y corazón.**



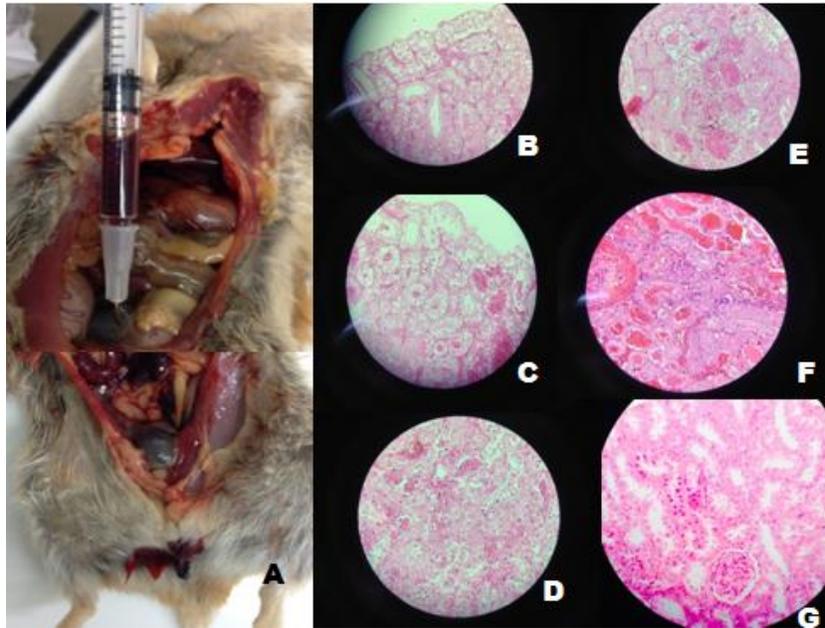
**Figura 18.- Lesiones macroscópicas y microscópicas en hígado.**



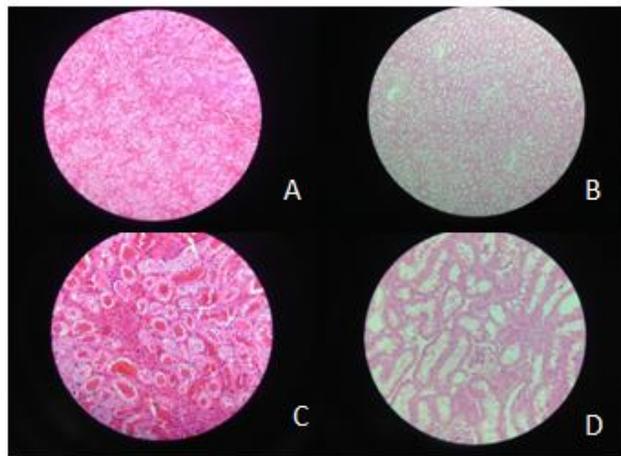
**Figura 19.- Lesiones esplénicas.**



**Figura 20 – Enteritis hemorrágica.**



**Figura 21.- Vejiga con hematuria y cortes histopatológicos mostrando lesiones renales.**

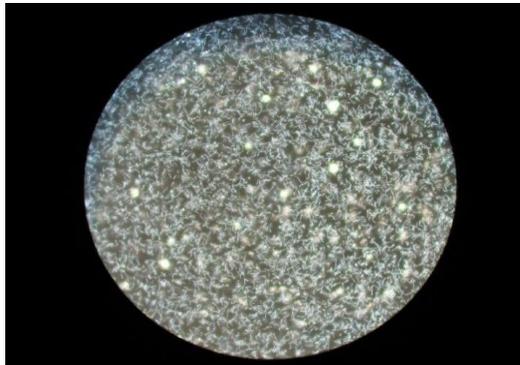


**Figura 22.- Comparación de cortes histológicos de tejido renal de un hámster tratado con EC (B, D) y tejido renal de un hámster tratado con ER(A, C).**

### 6.2.2 CAMPO OSCURO

Al momento de la muerte, ya sea por enfermedad o asistida por eutanasia, se realizó una observación directa de tejido renal en microscopio de campo oscuro buscando la presencia del microorganismo.

De los 36 hámsteres evaluados (18 para cada grupo), para el grupo ER en 12 animales (66.66%) fue posible observar leptospiras en tejido renal, mientras que para el grupo EC solo en 3 animales (16.66%) se observaron leptospiras (**figura 23**).



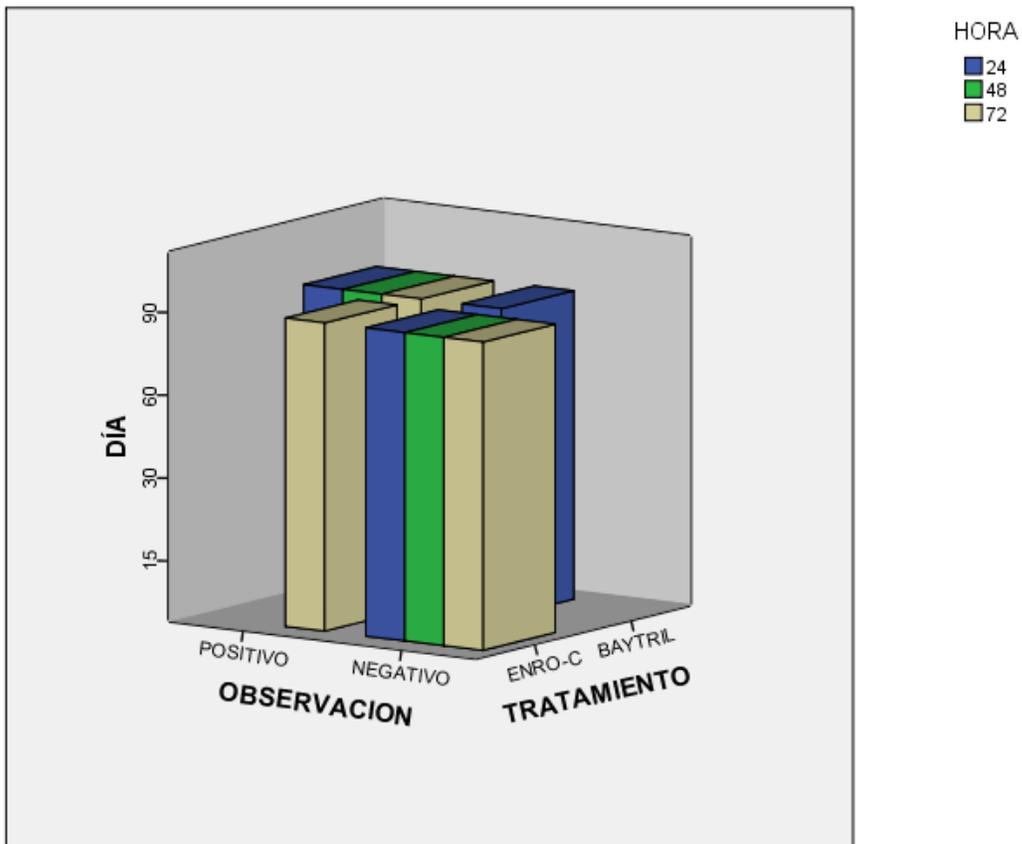
**Figura 23.- Imagen de *Leptospira interrogans* mediante microscopia de campo oscuro.**

### 6.2.3 CULTIVO

Mediante el modelo de regresión logística binaria con un intervalo de confianza de entre 2.013 y 9.976 se pudo determinar que en los animales tratados con ER presentaron 4.482 veces más riesgo de encontrar crecimiento de leptospiras en los cultivos obtenidos a partir de tejido renal que los animales tratados con EC ( $P < 0.05$ ) (**Cuadro 16 y Figura 24**).

**Cuadro 16.-Observaciones positivas de leptospiras en tejido renal a diferentes días.**

<b>ER</b>	<b>24 HORAS</b>	<b>48 HORAS</b>	<b>72 HORAS</b>
15 DÍAS	1/6	6/6	6/6
30 DÍAS	1/6	6/6	6/6
60 DÍAS	2/6	6/6	6/6
90 DÍAS	2/6	6/6	6/6
<b>EC</b>	<b>24 HORAS</b>	<b>48 HORAS</b>	<b>72 HORAS</b>
15 DÍAS	0/6	0/6	1/3
30 DÍAS	0/6	0/6	1/3
60 DÍAS	0/6	0/6	3/3
90 DÍAS	0/6	0/6	3/3



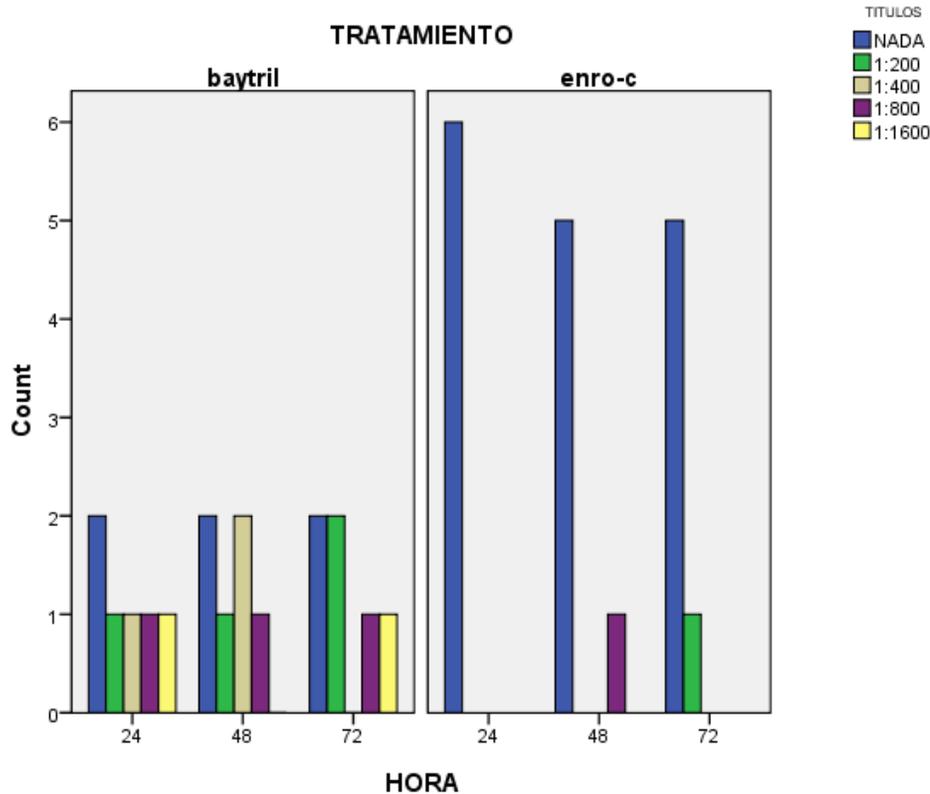
**Figura 24.- Días de observación del cultivo para ambos grupos.**

#### 6.2.4 AGLUTINACIÓN MICROSCÓPICA (AM).

Los sueros de los animales que resultaron positivos a la prueba tamiz, fueron usados para la prueba por extensión de diluciones, en donde se realizó la titulación de anticuerpos contra *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola presentes en el suero de los hámsteres (cuadro 17 y figura 25).

**Cuadro 17.- Número de animales positivos a la titulación de *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola mediante la prueba de extensión de diluciones.**

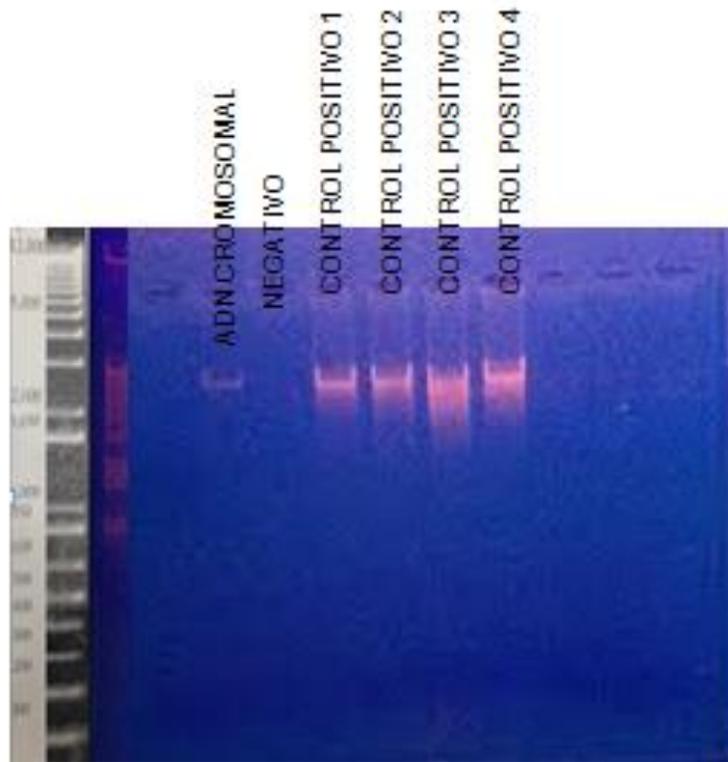
TITULO	ER	EC
1:200	4	1
1:400	3	0
1:800	3	1
1:1600	2	0



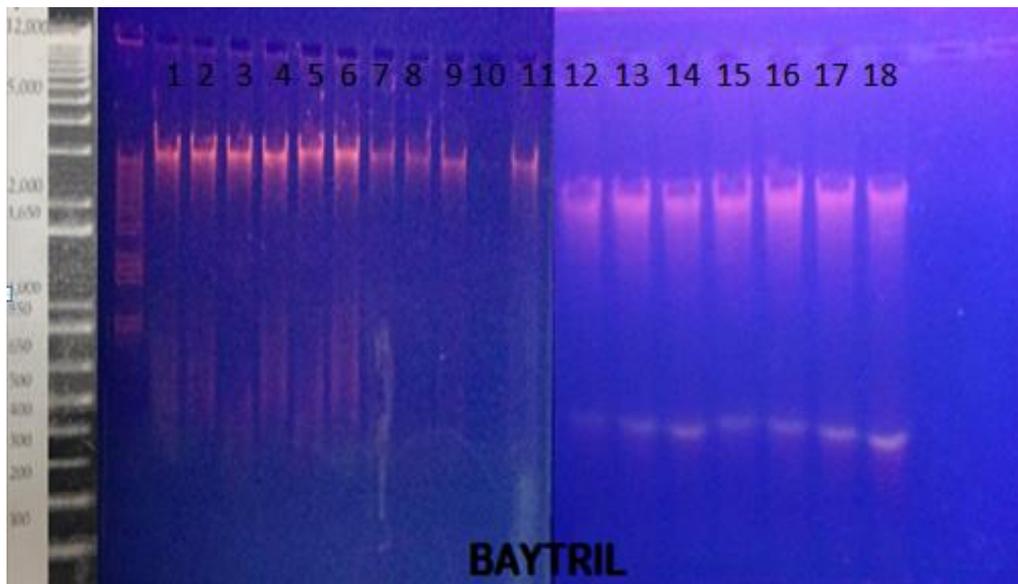
**Figura 25.- Representación gráfica de los títulos de anticuerpos para cada grupo ER y EC.(P<0.05)**

### 6.2.5 PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA).

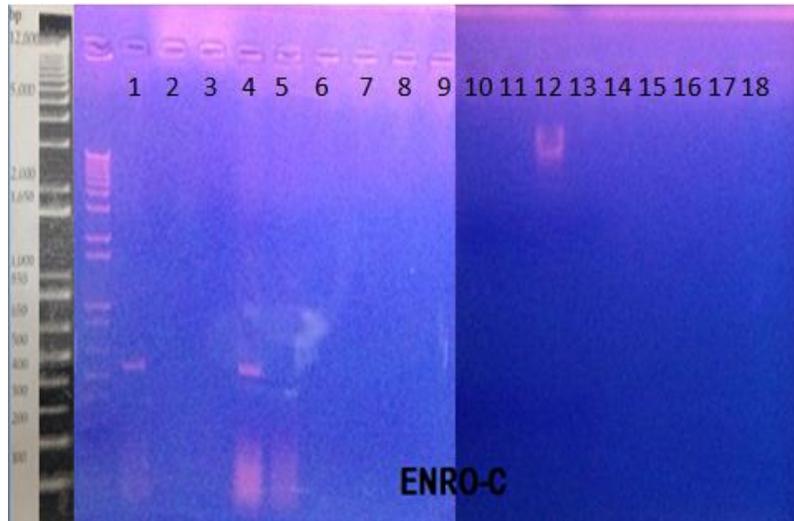
Se realizaron PCR punto final a partir de extracto de ADN de tejido renal de los 4 hámsteres control positivo que solo recibieron como tratamiento agua inyectable y 18 hámsteres para el grupo ER (Baytril) y los 18 hámsteres para EC (enrofloxacin re-cristalizada) respectivamente. Para el grupo control positivo, los cuatro animales que murieron al octavo día post-infección dieron positivo al correr el gel de agarosa (**figura 26**). Para el grupo ER 17 de los 18 animales dieron positivo al correr el gel de agarosa (**figura 27**). Para el grupo EC 4 de los 18 animales dieron positivo al correr el gel de agarosa. (**Figura 28**).



**Figura 26.- PCR a partir de ADN de tejido renal de los 4 hámsteres sirios control positivo..**



**Figura 27.- PCR a partir de ADN de tejido renal de los 18 hámsteres sirios tratados con ER.**



**Figura 28.- PCR a partir de ADN de tejido renal de los 18 hámsteres sirios tratados con EC.**

Mediante el modelo de regresión logística binaria se pudo determinar con un intervalo de confianza entre 2.379 y 11.785 que en los animales tratados con EC hubo 5.885 más riesgo de encontrar ADN de leptospira en tejido renal en comparación con los hámsteres tratados con EC ( $P < 0.05$ ).

## 7.-DISCUSIÓN

La enrofloxacinina no se encuentra entre los antibacterianos de primera elección para el tratamiento de leptospirosis en ninguna especie (Nelson y Couto, 2013; Greene, 2014), sin embargo mediante la manipulación de las propiedades del cristal de enrofloxacinina se modificaron sus propiedades farmacocinéticas de tal forma que a la misma dosis que el producto original se logra superar hasta 23 veces la  $C_{MAX}$  y 6.7 veces la AUC, con lo cual la EC logra concentraciones terapéuticas en tejidos blanco contra leptospirosis. El uso racional de los antibacterianos ha establecido que para las fluoroquinolonas, y en este caso la enrofloxacinina, es necesario generar un factor  $AUC/CMI \geq 125$ , para lograr una eficacia terapéutica contra el agente específico (Sumano y Ocampo, 2006) siendo así que para el presente estudio los datos cinéticos difieren sustancialmente entre ER y EC, proporcionándole a EC la ventaja terapéutica 4.4 veces por encima a ER, como se ha encontrado en este estudio las concentraciones tanto séricas como en tejidos están por arriba de esta concentración, lo cual podría ser la explicación de la gran diferencia de actividades terapéuticas entre ambas enrofloxacininas (ER vs EC). Vancustem et al (2006), reporto que la CMI de enrofloxacinina contra leptospirosis oscila entre 1-4  $\mu\text{g/mL}$ , con lo cual se justifica aun más el resultado obtenido.

La nueva forma recristalizada de enrofloxacinina, si bien, no garantiza al 100% la cura bacteriológica, la cura clínica fue satisfactoria, ya que no se presentaron muertes por la infección en el grupo EC durante el desarrollo del estudio e incluso las lesiones encontradas en los órganos afectados fueron mínimas así como la semiología que presentaron los animales durante el transcurso de la evaluación.

Este estudio representa el primeros de muchos estudios que pueden ser realizados con la nueva enrofloxacinina re-cristalizada dado que los resultados son alentadores, pudiendo realizarse evaluaciones en especies domesticas ya sea en animales de compañía como el perro o en especies pecuarias (bovinos, cerdos).

Los tratamientos utilizados actualmente, aunque pueden parecer una opción efectiva, realmente presentan muchas desventajas terapéuticas, como es el caso de la doxiciclina que a pesar de ser clínicamente útil es muy difícil lograr un tratamiento de más de 7–15 días ya que generalmente a partir del 3–4 día los animales no toleran la administración oral, por el grado de irritación gástrica que produce, sin mencionar que por vía intramuscular induce necrosis en el sitio de administración, siendo posiblemente la vía EV la única alternativa si no fuera por la dificultad de manejo que representa administrarla cada 12 horas y el grado de flebitis que induce, caso en el cual un animal no soportaría una terapia de más de 5 días (Suepaul et al., 2015; Greene, 2014). En el caso de los  $\beta$ -lactámicos utilizados terapéuticamente, presentan la gran desventaja de los cortos tiempos de redosificación lo cual provoca en muchas ocasiones terapias incompletas o mal administrada por parte de los propietarios además de los desbalance de flora intestinal que inducen. En el caso de la EC es necesario realizar estudios clínicos a largo plazo para definir la ventaja clínica que puede ofrecer. Considerando como una ventaja que su administración posiblemente sea cada 48 horas, faltaría definir la farmacocinética en especies como el perro.

## 8. CONCLUSIONES

- El nuevo cristal de enrofloxacin presenta una farmacocinética distinta al cristal original en hámsteres por vía subcutánea.
- Las concentraciones tisulares del nuevo cristal de enrofloxacin son superiores en concentración y estancia a lo encontrado y reportado para la enrofloxacin original.
- El nuevo cristal de enrofloxacin presenta un mayor potencial clínico en hámster infectados con *Leptospira interrogans* serovariedad Canicola que el producto original.

## 9.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ❖ Abuaud M, Osorio G, Rojas J, Pino L. Leptospirosis: Presentación de una infección fulminante y revisión de la literatura. Rev Chil Infect. 2005; 22 (1): 93-97.
- ❖ Adler Ben. Leptospira and Leptospirosis, Springer 2015.
- ❖ Alston JM, Broom JC. Leptospirosis in man and animals. E & S Livingstone, Edinburgh, UK 1958.
- ❖ Andicoberry C, García PF, Ortega M. Epidemiología, diagnóstico y control de la leptospirosis bovina. Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim. 2001; 16 (2).
- ❖ Aramayona JJ, García MA, Fraile LJ, Abadía AR, Bregante MA. Placental transfer of enrofloxacin and ciprofloxacin in rabbits. American Journal of Veterinary Research. 1994; 55, 1313-1318.
- ❖ Aramayona JJ, Mora J, Fraile LJ, Garcia MA, Abadia AR, Bregante MA. Penetration of enrofloxacin and ciprofloxacin into breast milk, and pharmacokinetics of the drugs in lactating rabbits and neonatal offspring. American Journal of Veterinary Research 1996; 57 (4)547-553.
- ❖ Arteaga T G, Jiménez JM, Montes JR, López HM, Luna AM, Hernández AL, Moreno AA, Galán JF, Guerra FM. Seroprevalence and risk factors associated with within-flock transmission of *Leptospira interrogans* in transhumant farming systems in Mexico. Epidemiol Infect. 2015; 20:1-9.
- ❖ Barnett JK, Barnett D, Bolin CA, Summers TA, Wagar EA, Cheville NF. Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters. Infect Immun. 1999; 67(2):853-61.
- ❖ Barragán VA, Mejía ME, Trávez A, Zapata S, Hartskeerl RA, Haake DA, Trueba GA. Interactions of leptospira with environmental bacteria from surface water. Curr Microbiol. 2011; 62(6):1802-6.
- ❖ Bennet JB, Brodie J, Benner E, Kirby W, Simplified accurate method for antibiotic assay. Clinical Specimens. American Society for Microbiology 1996; 14: 170-177

- ❖ Blagden N, Matas M, Gavan PT, York P. Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. *Advances Drug delivery Reviews* 2007; 59, 617–630.
- ❖ Birnbaum N, Barr SC, Center SA, Schermerhorn, T, Randolph JF, Simpson KW. Naturally acquired leptospirosis in 36 dogs: serological and clinicopathological features. *J Small Anim Pract.* 1998; 39:231–6.
- ❖ Bregante MA, Saez P, Aramayona JJ, Fraile L, Garcia MA, Solans C. Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin in mice, rats, rabbits, sheep, and cows. *American Journal of Veterinary Research* 1999; 60(9)1111-1116.
- ❖ Bregante MA, De Jong A, Aramayona JJ, García MA, Solans C, Rueda S. Protein binding of fluoroquinolones applied to livestock and companion animals. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 2000; 23 (suppl. 1) B16.
- ❖ Brown SA. Fluoroquinolones in animal health. *J Vet Pharmacol Ther* 1996; 19:1-14.
- ❖ Bustamante ME. La nueva epidemiología de la fiebre amarilla. Tres casos de enfermedad de Weil. *Gaceta Médica de México.* 1937 ;(67)10-24.
- ❖ Caballero SA, Romero GJ. Leptospirosis en México. Premio Canifarma. *Ind Farmaceut Vet* 1991; 1: 107-124.
- ❖ Carino SR, Sperry DC., Hawley M. Relative bioavailability estimation of carbamazepine cristal forms using an artificial stomach-duodenum model. *J Pharm Sci.* 2006; 95(1) 116-125.
- ❖ Castro MJ, Zamora EL, Valladares BC. Discusión de un caso diagnóstico. Nueva Época, Boletín Informativo de la Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México 2001; 5(3).
- ❖ Chieng AZ, Zujovic BG, Bowmaker BT, Rades AD. Effect of milling conditions on the solid-state conversion of ranitidine hydrochloride form 1N. *International Journal of Pharmaceutics.* 2006; 32:736–44

- ❖ Claire HF, Van HGJ, Laboratory animal medicine. Biology and diseases of hamsters. Academic Press 2002.
- ❖ Colín, Ortiz. Roberto. Et. al. Seroprevalencia a Leptospiras en trabajadores del sistema intermunicipal de los servicios de agua potable y alcantarillado. Guadalajara, México IMSS-Universidad de Guadalajara, INDRE,SSA,MEX.1997
- ❖ Costa F, Ribeiro GS, Felzemburgh RD, Santos N, Reis RB, Santos AC, Fraga DB, Araujo WN, Santana C, Childs JE, Reis MG, Ko AI, Influence of household rat infestation on leptospira transmission in the urban slum environment. PLoS Negl Trop Dis. 2014 ;8(12)
- ❖ Coutinho ML, Choy HA, Haake D. A LigA three-domain region protects hamsters 14 from lethal infection by *Leptospira interrogans*. PLoS Neg Trop Dis. 2011; 5:e1422.
- ❖ Espí A, Prieto JM, Fernández MM. Serological prevalence to six leptospiral serovars in cattle in Asturias (Northern Spain). Epidemiol. Infect.2000; 124, 599-602.
- ❖ Fajardo EM, Ortiz B, Chávez A, Gaínza N, Izquierdo L, Hernández Y, Labrador I, Alvarez E. Normalización de la dosis letal 50 % de cepas de *Leptospira interrogans* utilizadas en el control de la vacuna antileptospirósica cubana para uso humano. Rev Cubana Med Trop 1998;50(1):22-6
- ❖ Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. Leptospira and Leptospirosis 2nd. ed. Melbourne, Australia. MediSci.1999.
- ❖ García GR, Reyes TA, Basilio HD, Ramírez PM, Rivas SB. Leptospirosis; un problema de salud pública. Rev Latinoamer Patol Clin, 2013; 60 (1), pp 57-70.
- ❖ Gaschen FP. Canine Leptospirosis. Proceedings of the XXXIII World Small Animal Veterinary Congress. Dublin. Ireland. 2008; 1-4.
- ❖ Gavaldón DG, Cisneros MA, Rojas N, Moles-Cervantes LP. La importancia de la leptospirosis humana en México. Detección de anticuerpos

antileptospira en una población de donadores de sangre. Gac Med Mex 1995; 131: 289-292.

- ❖ Gerritsen MJ, Koopmans MJ, Olyhoek T. Effect of streptomycin treatment on the shedding of and the serologic responses to *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* subtype *hardjobovis* in experimentally infected cows. 1993; 38 (1, 2) 129–138.
- ❖ Guo Y, Fukuda T, Nakamura S, Bai L, Xu J, Kuroda K, Tomioka R, Yoneyama H, Isogai E. Interaction between Leptospiral Lipopolysaccharide and Toll-like Receptor 2 in Pig Fibroblast Cell Line, and Inhibitory Effect of Antibody against Leptospiral Lipopolysaccharide on Interaction. Asian-Australas J Anim Sci. 2015;28(2):273-9.
- ❖ Gutiérrez L, Miranda-Calderón JE, García-Gutiérrez P, Sumano H. Physicochemical characterization and pharmacokinetics in broiler chickens of a new recrystallized enrofloxacin hydrochloride dihydrate. J Vet Pharmacol Ther. 2015;38(2):183-9.
- ❖ Haake DA, Levett PN. Leptospirosis in humans. Curr Top Microbiol Immunol. 2015;387:65-97.
- ❖ Hartskeerl RA, Collares-Pereira M, Ellis W. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. Clin Microbiol Infect. 2011;17(4):494-501.
- ❖ Houwers DJ, Goris MGA, Abdoel T, Kas JA, Knobbe SS, van Dongen AM. Agglutinating antibodies against pathogenic *Leptospira* in healthy dogs and horses indicate common exposure and regular occurrence of subclinical infections. Vet Microbiol. 2011;148:449-51.
- ❖ Ido Y, Hoki R, Ito H, Wani H. The rat as a carrier of *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*, the causative agent of Weil's disease (*spirochaetosis icterohaemorrhagica*). J Exp Med 1917; 26:341-353.
- ❖ Inada R, Ido Y, Hoki R, Kaneko R, Ito H. The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease. (*Spirochaetosis icterohaemorrhagica*). J Exp Med 1916; 23:377-402.

- ❖ Jozwiakowski MJ, Nguyen NA, Sisico JM, Spancake CW. Solubility behavior of lamivudine cristal form in recrystallization solvents. J Pharm Sci. 1996; 85-2:193-19.
- ❖ Katz AR, Ansdell VE, Effler PV, Middleton CR, Sasaki DM. Assessment of the clinical presentation and treatment of 353 cases of laboratory-confirmed leptospirosis in Hawaii, 1974-1998. Clin Infect Dis. 2001 ;33(11):1834-41.
- ❖ Kawakami, K. Modification of physicochemical characteristics of active pharmaceutical ingredients and application of supersaturatable dosage forms for improving bioavailability of poorly absorbed drugs. Advanced Drug Delivery Reviews. 2012; 64, 480–495.
- ❖ Kim D, Kordick D, Divers T, Chang YF, In vitro susceptibilities of *Leptospira spp.* and *Borrelia burgdorferi* isolates to amoxicillin, tilmicosin, and enrofloxacin, J. Vet. Sci. 2006; 7(4) 355–359
- ❖ Knapman K. Polymorphic predictions: understanding the nature of crystalline compounds can be critical in drug development and manufacture. Modern Drug Discovery. 2000; 3, 53–57.
- ❖ Kung K, Riond JL, Wanner M. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and oral administration of enrofloxacin in dogs. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 1993; 16 (4)462-468.
- ❖ Langston CE, Heuter KJ. Leptospirosis: A re-emerging zoonotic disease. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2003;33:791-807.
- ❖ Lavrakas P. Sampling Pool. Encyclopedia of Survey Research Methods 2008.
- ❖ Lemarroy VD, Carrillo VM. Leptospirosis y disfunción orgánica múltiple. Caso clínico y revisión de la literatura. Revista de la asociación Mexicana de Medicina Critica y Terapia Intensiva. 2003; 17: 176-183.
- ❖ Levett PN, Leptospirosis. Clin Microbiol Rev. 2001; 14(2): 296–326.
- ❖ Manson-Bahr F. Enfermedades Tropicales. Barcelona: Ed. Salvat; p. 193-201. 1948.

- ❖ Major A, Schweighauser A, Francey T. Increasing incidence of canine leptospirosis in Switzerland. *Int J Environ Res Public Health*. 2014;11(7):7242-60.
- ❖ Mendoza Hernandez, P., Varela G, Mendez D. *Rev. Inst. Salubr. Enferm. trop.* 1958;18,37
- ❖ Mckellar QA. Clinical relevance of the pharmacologic properties of fluorquinolones. *Suppl Compend Contin Educ Pract Vet*. 1996; 18 (2): 14-21.
- ❖ Murray CK, Hospenthal DR, Determination of Susceptibilities of 26 *Leptospira* sp. Serovars to 24 Antimicrobial Agents by a Broth Microdilution Technique, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004;48(10): 4002–4005.
- ❖ Miranda-Calderón JE, Gutiérrez L, Flores-Álamo MP, García-Gutiérrez P, Sumano H. Enrofloxacin hydrochloride dehydrate. *A Crystallography Sec E*. 2014;700. 468-0469.
- ❖ Navarrete-Espinosa J, Acevedo-Vales J, Huerta-Hernández E, Torres-Barranca J, Gavaldón-Rosas DG. Prevalencia de anticuerpos contra dengue y *Leptospira* en la población de Jáltipan, Veracruz. *Sal Pub Mex* 2006; 48: 220-228.
- ❖ Navarrete-Espinosa J, Moreno-Muñoz, M, Rivas-Sánchez B, Velásco-Castrejón O. Leptospirosis prevalence in a population of Yucatán, México. *J Pathogens* 2011.
- ❖ Noguchi H, Kliger J. Immunological studies with a strain of *Leptospira* isolated from a case of yellow fever in Mérida, Yucatán. *J Exp Med* 1920; 32:627-637.
- ❖ Otero JL, Mestorino N, Erreclade JO, Enrofloxacin una fluoroquinolona de uso exclusivo en veterinaria Parte II. *Farmacocinética Veterinaria. Analecta Vet* 2001; 21 (1):42-49.
- ❖ Plank R, Dean D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira spp.* in humans. *Microb Infect* 2. 2000; 10 1265–1276.

- ❖ Prescott, JF, McEwen B, Taylor J, Woods,JP, Abrams-Ogg A, Wilcock, B. Resurgence of leptospirosis in dogs in Ontario: recent findings. *Canadian Veterinary Journal*. 2002;43: 955-961
- ❖ Prescott JF. Canine leptospirosis in Canada: a veterinarian's perspective. *Canadian Medical Association Journal* 2008;178, 397–398.
- ❖ *Reed & Muench*, *Am. J. Hyg.*, 1938; 27:493-497
- ❖ Russell & Burch. *The principles of human experimental technique*. 1959.
- ❖ Savjani KT, Gajjar AK, Savjani JK. Drug solubility: Importance and enhancement techniques. *Int Sholarity Res Not Pharm* 2012;(1), 1-10.
- ❖ Shekunov BY, York P. Crystallization processes in pharmaceutical technology and drug delivery design. *J. Cryst. Growth*. 2000; 211:122-136.
- ❖ Sikkema R, Hartskeerl RA, Ridder B, Estimating the burden of human leptospirosis, *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2010;36(1).
- ❖ Stimson AM. "Note on an organism found in yellow-fever tissue." *Public Health Reports* 1907; 22:541
- ❖ Suepaul SM, Carrington C, Campbell M, Borde G, Adesiyun AA. Antimicrobial susceptibility of *Leptospira* isolates from dogs and rats to 12 antimicrobial agents. *Trop Biomed*. 2015; 32(1):1-10.
- ❖ Sumano LH, Ocampo CL. *Farmacología Veterinaria*. 3era ed. México DF: Mc Graw-Hill Interamericana.2006.
- ❖ Sumano LH, Gutiérrez OL. *Farmacología clínica en bovinos de la enrofloxacin recrystalizada (enro-c)- una nueva fluoroquinolona*. XVI Congreso latinoamericano de Buiatría Ecuador 2013.
- ❖ Vado-Solís IA, Cárdenas-Marrufo MF, Laviada-Molina H, Vargas-Puerto F, Jiménez-Delgadillo B, Zavala-Velázquez JE. Study clinical cases and incidence of human leptospirosis in Yucatán, México from 1998 to 2000. *Revista Biomédica* 2002; 13:157-164.
- ❖ Vancutsem PM, Babish JG, In vitro and in vivo study of the effects of enrofloxacin on hepatic cytochrome P-450. Potential for drug interactions. *Veterinary & Human Toxicology* 2006; 38, (4)254-259

- ❖ Van den Ingh TS, Hartman EG. Pathology of acute *Leptospira interrogans* serotype 20 *icterohaemorrhagiae* infection in the Syrian hamster. *Veterinary Microbiology*.1986; 12:367-76.
  - ❖ Varela G, Zavala VJ. Estudio serológico de la leptospirosis en la República Mexicana. *Rev Inst Salubr Enf Trop* 1961; 21: 49-52.
  - ❖ Wagner S, Tassinari D, Pellegrini C, Renato B. Detection and modelling of case clusters for urban leptospirosis. *Tropical Medicine and International Health*. 2008; 13:503-512.
  - ❖ Wendy M, Townsend J, Sheryl G. Leptospirosis and panuveitis in a dog. *Veterinary Ophthalmology*. 2006; (9)3:169-173.
  - ❖ Weil A. Ueber eine eigentumliche, mit Milztumor, Icterus und Nephritis einhergehende akute Infektionskrankheit. *Deutsche Arch Klin Med* 1886; 39:209.
  - ❖ Zacarias FG, Vasconcellos SA, Anzai EK, Giraldi N, de Freitas JC, Hartskeerl R Isolation of leptospira Serovars Canicola and Copenhageni from cattle urine in the state of Parana, Brazil. *Braz J Microbiol*. 2008; (4):744-8.
-