

101
2ij



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FARMACOCINETICA DE LA CEFALQUINOLONA (CQEPCA)
EN PERROS**

TESIS

**PRESENTADA ANTE LA
DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES DE LA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

POR

ANA ISABEL OVALLE MARTINEZ

**ASESOR:
MVZ HECTOR SUMANO LOPEZ**



MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

A mi madre:

Ma. del Consuelo Martínez Aranda, quien me ha enseñado el gran significado de la vida y me ha sabido encauzar a través de ella con paciencia y amor. Por tu apoyo durante toda mi carrera, gracias mamá.

A Micaela Aranda y Manuel Martínez Casamayor quien siempre estará conmigo.

Agradecimientos

- Al Doctor Héctor Sumano López, por su apoyo, confianza y paciencia brindada para la realización de éste trabajo.

- A la Doctora Cristina Escalante Ochoa por su colaboración.

- A Corina Hevia del Puerto Puente por su apoyo incondicional y amistad.
Gracias.

- A Fabiola Ovalle, Chelito y Toño Villagomez, por ser mis mejores amigos y hermanos. Chelito gracias por tu ayuda en bioquímica.

- A Martha Carrillo por tantos momentos compartidos durante toda la carrera, gracias por tu amistad.

- A Jesús Lugo por toda tu ayuda y amistad.

- A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM por darme todos sus conocimientos para mi formación profesional.

- A mi jurado:

MVZ. Luis Ocampo Camberos

MVZ. Sara Caballero Chacón

MVZ. Jesús Paredes Perez

MVZ. Enedina Silva Cabrera

MVZ. Héctor Sumano Lopez.

Gracias.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
OBJETIVO.....	12
MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
RESULTADOS.....	18
DISCUSIÓN.....	19
LITERATURA CITADA.....	21
CUADROS.....	24
FIGURAS.....	27

RESUMEN

OVALLE MARTÍNEZ, ANA ISABEL. Farmacocinética de la Cefaloquinolona (CQEPCA) en perros (bajo la dirección de MVZ. Héctor Sumano López).

Se determinó la farmacocinética de la Cefaloquinolona CQEPCA en 8 perros a los que se les administró vía intravenosa una dosis de 3 mg/kg de CQEPCA cada 12 horas durante dos días. Se obtuvieron muestras sanguíneas durante varios tiempos seriados a lo largo del tratamiento. La relación entre concentración: tiempo de la CQEPCA se ajustó mejor a un modelo de dos compartimientos, con un volumen de distribución aparente del compartimiento central de 25 l/kg, así mismo un volumen de distribución aparente en el estado estable notablemente elevado de 4.03 l/kg y una vida de eliminación de 2 horas. Dada la enorme potencia de este antimicrobiano y considerando su elevado volumen de distribución, se lograron concentraciones plasmáticas bactericidas por unas cuantas horas únicamente, pero las concentraciones tisulares se predicen como muy elevadas durante un mínimo de 6 horas por lo que es posible que un intervalo de dosificación de 8 horas sea clínicamente eficaz en la mayoría de las infecciones bacterianas que cubre el espectro de este antibacteriano. El amplio margen de seguridad que se le ha calculado permite su dosificación a intervalos más cortos en infecciones de virulencia excepcional o más largos en casos de infecciones sensibles.

INTRODUCCIÓN

La industria farmacéutica moderna, solo tiene 65 años, sin embargo, en este lapso se ha revolucionado la práctica de la medicina al proveer a los especialistas de las enfermedades infecciosas fármacos que pueden salvar la vida; tales como las sulfonamidas, cefalosporinas, quinolonas, etc. Empero, no hay duda de que la utilización de conocimientos científicos y tecnológicos tiene un impacto significativo sobre el desarrollo, tanto económico como social y que en México existen diversas instancias y modalidades que buscan propiciar la vinculación entre las universidades.

La industria farmacéutica veterinaria se caracteriza principalmente por el alto grado de tecnología requerido para la elaboración de sus productos, y por la investigación y desarrollo de nuevos compuestos con el objetivo primordial de prevenir, tratar o controlar problemas de diversa índole que afectan la productividad de la industria pecuaria.

Actualmente, el descubrimiento de nuevos antimicrobianos en medicina humana y medicina veterinaria se encuentra a cargo de universidades e institutos de investigación dependientes de empresas farmacéuticas que se encuentran en países altamente desarrollados. Anualmente las grandes corporaciones farmacéuticas en el mundo destinan gastos inmensos para el desarrollo de nuevas moléculas y en México, como contraste, ningún laboratorio hasta ahora había destinado recursos para el desarrollo de moléculas originales*.

* Memorias. Problemática del uso de Antimicrobianos en farmacología.FMVZ. UNAM. Asociación Mexicana de farmacología veterinaria. Departamento de Fisiología y Farmacología del 3 al 6 de abril de 1995.

En la última década, los grupos de antimicrobianos que más han evolucionado, que mayor espectro han cubierto y que mayor potencia han mostrado son las cefalosporinas y las fluoroquinolonas (24).

Durante la década de 1970-1980, las cefalosporinas proliferaron en cuanto al número, el espectro de actividad, las prescripciones efectuadas por los médicos y el costo para el sistema de atención de la salud. Sin embargo, la manipulación bioquímica de la molécula de cefalosporina podía afectar el espectro de actividad antibacteriana, la vida media sérica o ambas cosas. Estas observaciones llevaron a una intensa actividad de investigación por parte de la industria farmacéutica y una profusión de nuevos antibióticos.

Actualmente existen tres generaciones de cefalosporinas. Las cefalosporinas de primera generación; que son activas contra organismos Gram positivos. Son sensibles a β lactamasas (cefalosporinasas) y no tan eficaces contra Gram negativos. En este grupo se encuentran la cefalotina, cefaloridina, cefapirina, cefazolina, cefalexina, cefradina y cefadroxil.

Las cefalosporinas de segunda generación son activas contra gérmenes Gram positivos y Gram negativos. Asimismo son resistentes a β lactamasas, e ineficaces contra enterococos, *Pseudomonas aeruginosa*, *Actinobacter spp* y anaerobios obligados. Dentro de esta clasificación se encuentran; cefamandol, cefoxitina, cefotiram, cefacior, ceforoxima y ceforanida.

Las cefalosporinas de tercera generación son moderadamente activas contra Gram positivos, sin embargo son activas contra gran variedad de Gram negativas, incluso contra ciertas especies de *Pseudomonas spp*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter spp* y *Citrobacter spp*. Las cefalosporinas de tercera generación son resistentes a β lactamasas y a menudo penetran barrera hemato encefálica (23).

Propiedades generales

Las cefalosporina C, obtenida a partir de la cepa de *Cephalosporium acremonium*, tiene un anillo β lactámico y un anillo de dihidrotiazina adyacente que se presenta en la figura 1. El tratamiento ácido de la cefalosporina C, la hidroliza al ácido 7 aminocefalosporánico (7 ACA) (figura 2). En sí el compuesto 7-ACA no tiene actividad biológica y se utiliza como materia prima para aumentar radicales en los sitios especificados en la figura 2 (23). Éste mismo grupo se utilizó en la reacción de la cefaloquinolona mediante una reducción con el grupo carboxilo del radical 4-quinolónico en la posición 3, dando lugar a un enlace carboxamido y una fórmula general como la que se presenta en la figura 3.

Con respecto a las quinolonas, hasta ahora se habían conceptualizado únicamente tres generaciones, más ya se están desarrollando por lo menos otras 25. Algunas ya han sido evaluadas en estudios clínicos (18). Desafortunadamente en México éste no es el caso. A menudo se hacen extrapolaciones de especie a especie de manera precipitada, obediendo más a la presión comercial que a criterios clínico-farmacológicos, debido a que se han convertido en el grupo de medicamentos más utilizados en las épocas de los ochentas y noventas (24), ya que ofrecen significativas ventajas en cuanto a farmacocinética, el espectro de actividad y el bajo costo (23).

Estructura y actividad.

Leshner (citado por Albrecht (1)), puso a la disposición de la comunidad médica en 1960, la primera quinolona antibacteriana, el ácido nalidixico, fármaco que pronto encontró un lugar en la terapéutica de las infecciones de vías urinarias. Con el tiempo, se encontró que generaba rápidamente resistencias bacterianas, lo que limitó su uso. Es probable, sin embargo, que el efecto de resistencia haya sido confundido con el paradójico comportamiento que muestra este antibacteriano, el cuál a dosis terapéuticas tiene un efecto

bactericida, mientras que a dosis mayores pierde casi toda acción antibacteriana (4,9). Ésto se ha explicado en función de que el ácido nalidíxico induce la producción de proteínas tóxicas por la misma bacteria que la hacen autodestruirse (26). Al elevarse la dosis, se inhibe además el ADN el ARN por lo que se bloquea la síntesis proteínica y con ella el efecto autotóxico referido (2,9). Es posible que en mayor o menor grado, otras quinolonas de primera generación tengan este comportamiento.

De cualquier manera, el ácido nalidíxico ha sido de gran valor para la quimioterapia de las enfermedades bacterianas en virtud de haber contribuido con el núcleo básico de los compuestos de mayor impacto en la última década, las fluoroquinolonas.

Las quinolonas contienen un grupo de ácido carboxílico en la posición tres del anillo estructural básico. (Figura 4) (27). Las fluoroquinolonas más recientes también contienen un sustituyente flúor en la posición 6 y muchos de estos compuestos contienen un grupo piperazina en la posición 7 (13).

El núcleo básico de las fluoroquinolonas se presenta en la figura 5 en la que se señalan los sitios en los que es posible añadir algún otro radical para buscar nuevas acciones antibacterianas. Abundan datos acerca de las manipulaciones de la molécula, de tal suerte que aquí solo se presentan los resultados resumidos de dichos intentos (24).

Posición 1. Desde los primeros estudios se descubrió que en la posición 1 existía un largo óptimo de la molécula (índice STERIMOL¹) de 0.42 nm y se encontró que el grupo ideal en esa posición era el ciclopropilo en función de sus características estéricas, espaciales de interacción electrónica con su potencial

¹ Programa de computación para la simulación de acoplamiento de un fármaco a su receptor.

receptor, la ADN girasa. Recientemente se encontró que un sustituto *t*-butilo aumenta la eficacia contra Gram positivos sin mucha pérdida contra Gram negativos (1,4,15)

Posición 2. Poco se ha logrado a este nivel. La cinoxacina ha introducido un N en esta posición logrando importantes ventajas farmacocinéticas, pero perdiendo potencia antibacterina (7).

Posiciones 3 y 4. En ellas no se ha podido modificar los grupos carboxílico y cetona, aparentemente necesarios para la unión de la molécula a la ADN girasa (1,15).

Posición 5. Se han intentado sustituciones en esta posición con grupos N, NH₂, halo y alquilo, y no se han logrado resultados importantes. De hecho, existen opiniones encontradas, pues hay quienes mencionan que tienen una reducción en la eficacia antibacteriana y quienes sostienen lo contrario (15).

Posición 6. De las sustituciones a este nivel, indudablemente que el F representó el avance más importante de las quinolonas de primera generación, haciéndolas de segunda. Si se quiere hacer una división en las quinolonas, tal sustitución es verdaderamente marcada, ya que con ella se mejora la unión a la ADN girasa en 2 a 17 veces y la penetración celular en 1 a 70 veces con respecto a las quinolonas que no tienen F en la posición 6 (10). Todas las fluoroquinolonas de mayor potencia y utilidad clínica tienen un F en la posición 6.

Posición 7. En esta posición se han intentado numerosas manipulaciones con mayor o menor éxito. Así como el F en posición 6 distingue a las quinolonas de segunda generación, en esta posición se distinguen las quinolonas de tercera. Se ha visto que la afinidad por la ADN girasa aumenta de manera directamente

proporcional con lo voluminoso del sustituyente. Esto es, moléculas lineales en este radical muestran menos potencia que radicales cíclicos como el de la enrofloxacin y la danofloxacin (4,15). Las diferencias entre la segunda y tercera generaci3n de quinolonas se han hecho evidentes con los pocos estudios disponibles en t3rminos de distribuci3n. Nouws *et al* comentan acerca de dos quinolonas muy parecidas estructuralmente (la ciprofloxacina de segunda generaci3n y la enrofloxacin de tercera generaci3n) que la segunda logra el doble de las concentraciones plasmáticas que la primera bajo iguales condiciones experimentales, a pesar de que la diferencia entre ambas quinolonas es de un etilo en la posici3n 4 del anillo, inserto en la posici3n 7 de la quinolona (20).

En este momento es prudente aclarar que la actividad *in vitro* de las fluoroquinolonas de segunda generaci3n es muy buena. En cuanto a la actividad de la ciprofloxacina, se ha dicho que es excelente, con notable acci3n contra los micoplasmas mäs comunes en veterinaria (6,16,22). Desafortunadamente, no se cuenta con mäs datos acerca del destino de este fármaco en el organismo de las distintas especies y por ello aún no se pueden establecer indicaciones precisas de eficacia para diversas enfermedades. Dicho de otra forma, ésto no significa que el medicamento carezca de actividad para controlar las enfermedades en los animales dom3sticos, sino que, al igual que en muchas quinolonas como la tusofloxacina, la feroxacin, la norfloxacina, la enoxacin y 340 derivados mäs, aún no se cuenta con datos farmacol3gicos que hagan de su uso un ejercicio mäs profesional y por ende se les pueda ubicar en el contexto clínico al que pertenecan (14).

Posici3n 8. En este sitio la sustituci3n con un radical "N" (tosufloxacina) u "O" (ofloxacina), ha mejorado los rasgos farmacocinéticos, aunque no tanto los antimicrobianos, de tal manera que la p3rdida de la actividad *in vitro* se sustituye con una mejor actividad *in vivo* (6,12,19).

Como puede apreciarse en esta descripción el desarrollo químico de quinolonas y fluoroquinolonas y la modificación del grupo carboxilo daba lugar a la inactivación de la molécula. Dado lo prolífico de esta molécula es difícil establecer todas las posibles relaciones de estructura actividad; por ello, desde el punto de vista de la farmacología veterinaria, lo importante es que se le someta a pruebas farmacológicas antes de ubicar su valor para la clínica (24).

En este contexto México llevó a cabo una idea atrevida dentro del desarrollo de las fluoroquinolonas, ésto es, la sustitución del carboxilo de la posición tres, considerada como posición estratégica, hasta ese momento, y clave para la unión de la fluoroquinolona con su objetivo (la topoisomerasa II)(8). Lejos de obtener una reducción en la actividad, se logró una notable mejoría marcando así, lo que se puede calificar como el inicio de las fluoroquinolonas de cuarta generación. En la actualidad esta molécula y muchos análogos más han recibido su patente mundial¹ (21).

Es posible que la diferencia entre la falta de actividad detectada por otros investigadores al sustituir este radical y la enorme actividad lograda con esta nueva molécula se deba a que la sustitución se hizo con una cefalosporina, constituyendo una molécula que se ha denominado cefaloquinolona (CQEPCA).

Aún no se sabe con precisión a que se debe la mejor actividad antimicrobiana de la CQEPCA con respecto a los componentes por separado. Es posible que la CQEPCA tenga un mecanismo antibacteriano doble, esto es, tanto en el citoplasma bacteriano inhibiendo el desenrollamiento del ADN, como en la pared, a través de la inhibición de la polimerización de los nucleótidos de Park (7). Se han desarrollado estudios para determinar con exactitud la participación

¹ Patente Europea: 94-325-A-Mx.

de estas vías del metabolismo bacteriano y quizá otras en el mecanismo de acción de esta novedosa molécula. Hasta la fecha las evidencias indican que la actividad antibacteriana de la CQEPCA persiste en bacterias resistentes a cefalosporinas y lo mismo sucede cuando hay resistencia para fluorquinolonas, pero en contadas cepas de *Pseudomonas spp* en las que se ha detectado resistencia tanto a cefalosporinas como a fluoroquinolonas, se reduce la actividad de la CQEPCA¹.

Toxicidad aguda. A la fecha se han realizado múltiples ensayos para determinar la DL 1%, DL 50%, DL 99% y margen terapéutico en ratas y ratones. Los resultados reflejan consistentemente una toxicidad baja; desde 600 mg/kg hasta 6 g/kg². Comparativamente con la toxicidad conocida de otros antimicrobianos utilizados rutinariamente (aminoglicosidos, cloranfenicol, rifampicina, etc) (25), la CQEPCA muestra notables ventajas. No obstante, aún resta llevar a cabo las pruebas de toxicidad subaguda (subcrónica), mismas que deberán incluir estudios de genotoxicidad³. Dada la gran actividad biológica *in vitro* de la CQEPCA contra múltiples bacterias y por su baja toxicidad en ratones, tanto por vía oral como parenteral, se ha considerado como consecuente el desarrollo de la farmacocinética de este compuesto en perros. La principal razón para llevar a cabo estudios farmacocinéticos en esta especie es la posibilidad de que se consideren estos datos como precedentes para un estudio equivalente en seres humanos (clínico-farmacocinético), y el de contar con un nuevo antimicrobiano para esta especie.

En este trabajo se planteó el obtener los valores farmacocinéticos más importantes del fármaco, y así conocer su absorción, distribución,

¹ IMSS de Querétaro, estudio con más de 200 bacterias hospitalarias.

² Dr. E. Lorenzana, Departamento de Farmacología. FM. UNAM

³ Bióloga Isabel Gracia M. Departamento de Química Inorgánica. Facultad de Química. UNAM.

biotransformación o metabolismo, biodisponibilidad y eliminación. Ésto se lleva a cabo a partir de la obtención de los siguientes parámetros farmacocinéticos:

- Concentración máxima lograda (C_{po}) es la cantidad máxima de fármaco alcanzada en el plasma.
- Área bajo la curva (ABC) es una herramienta de biodisponibilidad que en la concentración plasma-tiempo es útil para medir la ocupancia, el tiempo durante el cual es ocupado determinado volumen de plasma por el fármaco.
- 1er. momento del área bajo la curva (MABC) será el primer valor detectado en la curva de concentración plasma-tiempo en el que el fármaco ocupa un determinado volumen de plasma.
- Vida media plasmática ($T_{1/2 \beta}$) que se define como el tiempo necesario para que se reduzca en un 50% la concentración del fármaco en el plasma.
- Volumen de distribución central (V_{d c}) que es la cantidad de fluido extrapasmático necesario para diluir el medicamento a la misma concentración que la existente en el plasma.
- Volumen de distribución por área (V_{d área}) se define como el volumen de líquido necesario para contener la cantidad de fármaco en el cuerpo, si fuera distribuido uniformemente a una concentración igual a la que existe en el plasma.
- Volumen de distribución estable (V_{dss}) es la cantidad de fluido que permanecerá estable durante la aplicación constante del fármaco a un intervalo de dosificación determinado.
- Determinación del número de compartimientos (1 ó 2) para poder conocer la distribución, el movimiento y el equilibrio que tiene un fármaco dentro del organismo. Puede ser un modelo abierto de un compartimiento en el que el organismo se considera como un solo cuerpo sin barreras internas y el fármaco se distribuye casi inmediatamente en todo el organismo. También existen otros modelos similares al anterior, en los que se considera al organismo como un cuerpo con entidad central (plasma) y otra periférica extrapasmática, y en este

caso la eliminación va a ser a partir del compartimiento central e inmediatamente se establecerá un equilibrio con la periferia.

- Determinación del tipo de cinética al intervalo de dosificación utilizado (de orden 0 ó de 1er. orden) para conocer el desplazamiento del fármaco. Puede ser por una cinética de primer orden en donde el medicamento pasará de un lado a otro de la membrana en función de la cantidad el fármaco en un compartimiento. También puede ser por una cinética de orden cero en la que hay una participación de un sistema enzimático o de transporte saturable, y la eliminación no se incrementa al aumentar la concentración, una vez que el sistema enzimático o de transporte se ha saturado.
- Tangente de distribución-eliminación (β) es la constante aparente de distribución total y de velocidad de eliminación total del fármaco.
- Depuración total o corporal del organismo (Cl_R) es la cantidad de sangre que queda libre del fármaco por varias vías en una unidad de tiempo (5,25,11).

OBJETIVO

Estudiar la farmacocinética plasmática de la CQEPCA en perros tras su administración endovenosa.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 8 perros clínicamente sanos, criollos, tanto hembras como machos. Se les examinó y se les declaró clínicamente sanos, amén de que resultaron con química sanguínea (urea, creatinina, colesterol y glucosa), y hemograma normales. Se les alimentó *ad-libitum* con alimento comercial y se les dividió en dos grupos de 4 animales cada uno; ambos grupos recibieron el medicamento (CQEPCA) a una dosis de 3 mg/kg cada 12 horas^{*} vía IV 3 dosis, utilizando catéter fijo del número 18 al que se le mantuvo permeable con heparina.

En el primer grupo se obtuvieron muestras de sangre post-administración a los 5 y 30 minutos la primera hora y después a las 2, 5, 9 y 12 horas, antes de la administración de la segunda dosis. Posteriormente se tomaron muestras a las 25 horas (1 hora después de la tercera dosis) y a las 28 y 33 horas.

Al ver los resultados obtenidos de las muestras pertenecientes al primer grupo de perros se decidió tomar las muestras en el segundo grupo a los 2,5,17 y 30 minutos, 1 y 2 horas. Con estas segundas muestras se realizaron los mismos pasos descritos anteriormente.

Las muestras fueron tomadas con vacutainers con EDTA y la sangre se centrifugó a 10,000 rpm para la obtención del plasma, el cual se transportó con pipetas estériles a envases estériles y se les congeló a -4°C, hasta su análisis.

Se estimaron las concentraciones plasmáticas de la CQEPCA, mediante el método de difusión en placa diseñada por Bennet et al (3) que consiste en la determinación de las concentraciones sanguíneas de la fracción activa por

* Este intervalo de dosificación es arbitrario, pero sirve para evaluar si hay acumulación en el caso de que su intervalo idóneo sea cada 24 horas, aún resulta útil este intervalo pues permite todos los cálculos cinéticos, incluyendo el de intervalo de dosificación.

difusión en placa y que ha sido considerado tan sensible como el High Performance Liquid Chromatography (HPLC) para moléculas similares (17), estandarizado con plasma de perros y una cepa ultrasensible de *Escherichia coli* como microorganismo prueba.

1) Obtención de la cepa para la prueba: Se obtuvo del laboratorio de Microbiología y Bacteriología de la FMVZ, UNAM. Con un isopo estéril se tomó la muestra y se sembró en una caja de petri con medio selectivo y diferencial, agar verde brillante (V.B.), mediante la técnica de aislamiento en cultivo puro y se incubó 24 horas a 37°C, el cultivo obtenido se sembró con la técnica de estria continua en otra caja de petri con agar V.B. y se incubó 24 horas a 37°C. De esta manera, se utilizaron cultivos jóvenes de 24 horas de *Escherichia coli* para toda la prueba.

2) Preparación del material: Se utilizaron refractarios tipo Pyrex resistentes al calor de 22 cm X 22 cm y de 5 cm de altura, cuyo borde superior es esmerilado, sometidos a un lavado con agua y jabón, desgrásandolos, una vez secos, con alcohol al 70%, posteriormente fueron sellados con dos capas de plástico de silicon (Ega-Pack) y envueltos en papel estroza para su esterilización con autoclave a una temperatura de 121°C y una presión de 15 lb, durante 15 minutos.

Los medios utilizados fueron agar Müller-Hinton (M-H) y caldo infusión cerebro corazón (CICC), preparados según especificaciones del producto y posteriormente esterilizados en el autoclave (121°C/15 lb/15 min).

3) Estandarización de la prueba: Ésta se llevó a cabo para determinar la concentración de bacterias, la concentración del fármaco, y el volumen de agar a utilizar a lo largo de toda la investigación y poder así comparar los resultados a obtener a partir de las muestras.

a) Concentración de bacterias: Se utilizó un inóculo obtenido del cultivo joven de *E.coli* en agar V.B. que se sembró en un tubo con 4 ml de CICC, se homogeneizó y se estandarizó en el espectrofotómetro Bausch & Lomb, hasta alcanzar una lectura de 0.6 de absorbancia al utilizar un filtro para medir una longitud de onda con luz visible de 530 nm lo cual correspondió a 112.5×10^7 UFC/ml. De aquí se tomaron 1.6 ml (inóculo estandar) y se agregaron a 200 ml de agar M-H estéril, y tibio, lo que determinó una concentración final bacteriana de 1.41×10^{11} UFC/ml.

b) Concentración del quimioterapéutico: El fármaco utilizado fué CQEPCA. El límite inferior de sensibilidad de detección de este método ha sido establecido en este laboratorio a $0.001 \mu\text{g}$ de CQEPCA/ml de plasma. Lo cuál se hizo realizando diluciones doble seriadas.

c) Se utilizaron 200 ml de agar MH / refractario para toda la prueba.

4) Preparación de las placas de agar: Una vez estériles los refractarios, se les quitó el papel y se colocaron entre dos mecheros de Bunsen lo más cercano posible con el cuarto cerrado evitando corrientes de aire, se destaparon y se les vació el agar M-H (200 ml/ refractario) inmediatamente después de haberse agregado el inóculo estandarizado y homogeneizado. En este momento con el mechero se quitaron las posibles burbujas de aire que hablan quedado y se tapó herméticamente con el Ega-Pack. Se dejó solidificar en una superficie plana durante 1 hora aproximadamente. Una vez solidificado, se le realizaron 25 perforaciones equidistantes una de otra de 4.4 cm, con un sacabocados de 0.05 cm de diámetro, para lo cuál se utilizó un diagrama con las posiciones de las perforaciones debajo del refractario.

Una vez realizado ésto, con micropipeta se tomaron $100 \mu\text{l}$ de cada una de las diluciones y se fueron colocando en los pozos utilizando una puntilla diferente en cada ocasión. Se identificaron los pozos en el refractario y se incubaron a 37°C por 24 horas.

5) **Lectura de los halos de inhibición:** Al día siguiente se midieron los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano con un Vernier.

6) **Análisis de las muestras:** Para el análisis de las muestras se utilizaron los mismos pasos que para la preparación de las placas de agar, con la diferencia de que en lugar de utilizar diluciones del fármaco se aplicaron directamente 100 µl de los sueros obtenidos de las muestras. Los resultados (halos de inhibición) se compararon contra la línea estándar para determinar la concentración plasmática del fármaco en cada muestra.

7) **Determinación de la cinética del quimioterápico:**

Las variables cinéticas que se determinaron se presentan en el cuadro 1.

Las variables serán estimadas considerando un modelo de dos compartimientos abiertos, conforme a la cinética demostrada por compuestos similares (21,3) y cuyo modelo se presenta en la figura 6.

Las variables farmacocinéticas se calcularon utilizando modelos compartimentales y un programa de computación (R-STRIP¹) y las siguientes fórmulas

Volúmen de distribución aparente del compartimiento central

$$Vd_c = \frac{\text{Dosis IV}}{C_{PO}}$$

Volúmen de distribución aparente (área)

$$Vd \text{ \acute{a}rea} = \text{Dosis}_{IV} / \text{AUC} \cdot \beta$$

¹ • MicroMath Scientific Software, Salt Lake City, Utah (1993).

Volumen de distribución aparente en el estado estable

$$Vd_{ss} = \text{Dosis} \cdot \text{AUMC} / \text{AUC}^2$$

Depuración sistémica

$$Cl_s = \text{Dosis} / \text{IV/AU}$$

Concentración de CQEPCA al tiempo cero

$$Cp_0 = A + B$$

donde A= Concentración de CQEPCA al tiempo cero extrapolada por linealización de residuales y B= concentración de la fase terminal.

$$K_{21} = A \beta + B \alpha / A + B$$

$$K_{10} = \alpha \beta / K_{21}$$

$$K_{12} = \alpha + \beta - K_{21} - K_{10}$$

RESULTADOS

Se determinaron las concentraciones plasmáticas de la CQEPCA en 8 perros, totalizando 52 muestras. Los valores obtenidos se presentan en el cuadro 2, en el que podemos observar las concentraciones plasmáticas de la CQEPCA después de su aplicación intravenosa a dosis de 3 mg/kg. Obteniendo concentraciones máximas a los 2 minutos de 0.3 $\mu\text{g/ml}$ de plasma, hasta una concentración mínima a las 8 horas de 0.0006 $\mu\text{g/ml}$ de plasma. En la figura 7, se presenta una regresión lineal de la concentración de CQEPCA $\mu\text{g/ml}$ (valores obtenidos de diluciones doble seriadas) contra el halo de inhibición, en la cuál se realizó un ajuste cercano de acuerdo a su tendencia, donde se observa el límite inferior de sensibilidad de 0.002 $\mu\text{g/ml}$, esta gráfica se utilizó para la determinación de las concentraciones del cuadro 2.

La gráfica de los resultados de manera semilogrítica, se ajustó mejor a un modelo de dos compartimientos, como se demuestra en la figura 8. En la figura 9 se presenta la misma relación, con los valores medios y desviaciones estandar.

Tomando a los perros de manera global, se presentan en el cuadro 3 los valores farmacocinéticos medios y desviación estándar de la CQEPCA, en donde es notable el V_d de 25 l/kg, $V_{d\alpha}$ de 4.03, y un Cl , y K_{10} de 65 ml/min/kg y 2.5 hr^{-1} respectivamente.

Los datos de las químicas sanguíneas y valores hematológicos permanecieron constantes. Todos los perros completaron el tratamiento de tres dosis en dos días y no se detectaron alteraciones clínicas, aunque cabe mencionar que la dosificación repetida, produjo cierta alteración del estado anímico de los animales.

DISCUSIÓN

Con el análisis bacteriológico-cuantitativo diseñado por Bennet *et al* se evalúa únicamente la farmacocinética de la porción bioactiva de la molécula. Ésto brinda datos farmacocinéticos de mayor relevancia clínica y de aplicación directa a casuística. La notable potencia de CQEPCA permitió la detección confiable de concentraciones tan bajas como 0.001 $\mu\text{g/ml}$. Al parecer, CQEPCA tiene un coeficiente de partición lípido-agua tan alto, que dió lugar a una cinética que se ajustó mejor a modelo de dos compartimientos y a un volumen de distribución aparente del compartimiento central de 25 l/kg. Asimismo, tanto el volumen de distribución en el estado estable ($V_{dss}=4.03$ l/kg) como el volumen de distribución AUC (3.64l/kg) fueron notablemente elevados. Estos valores se vieron limitados por unas constantes K_{10} y Cl_s , muy eficientes.

Las fluoroquinolonas tienen baja unión a las proteínas plasmáticas, lo que explica en parte su buena distribución. Si se considera que parte de esta molécula es una fluoroquinolona, es posible especular que su comportamiento haya sido similar. Ésto explicaría, al menos en parte, los elevados valores de K_{10} (2.45 hr^{-1}) y Cl_s (65 ml/min/kg) obtenidos para la CQEPCA. Estos datos sugieren que la administración de la CQEPCA puede llevarse a cabo cada 6-8 horas de manera ideal, aunque dada la potencia por un lado y la inocuidad que se ha observado con ella, estos intervalos se pueden alargar o acortar, de acuerdo con las necesidades del caso.

La penetración tisular de CQEPCA se puede considerar como excepcional, lo que se hace evidente con las concentraciones plasmáticas al tiempo cero ($Cp_0 = 0.120$ $\mu\text{g/ml}$), que sugieren una distribución al compartimiento celular. Si se considera este aspecto de distribución con el hecho de que muchas fluoroquinolonas modernas son bactericidas eficientes al concentrarse a dos veces la CMI (26), se puede pensar que la CQEPCA tendrá un efecto bactericida notable a nivel tisular ya que se lograrán concentraciones

bactericidas en tejidos clave (v.g. pulmón). Esta última observación queda reforzada con los bioensayos realizados en ratón, desafiados con *Pasteurella multocida* tipo A. patógena y que brindaron un 100% de protección^{*}.

El potencial terapéutico de este medicamento no puede determinarse con el tipo de ensayo que se realizó, por lo que se sugiere como prueba consecuente a ésta, la realización de estudios clínicos controlados, en particular si se considera que estudios previos, han arrojado muy baja toxicidad^{**}. Evidentemente se requiere un análisis de toxicidad subclínica en la ó las especies a las que será destinado este medicamento.

En México, no se ha desarrollado con éxito a la fecha, un medicamento antimicrobiano. Por lo que por su baja toxicidad, su aparente eficacia en los modelos de desafío, su cinética favorable y la originalidad de su molécula, resulta poco aventurado pensar que la CQEPCA puede convertirse en el primer antimicrobiano de tecnología nacional ó generado por tecnología propia.^{***}

* PMVZ. Guillermo Vazquez Ramos : Farmacocinética de la cefaquinolona CQEPCA 297 en Ratones.

** Bio ensayos en Ratón.

*** El fármaco ya tiene patente internacional.

LITERATURA CITADA

- 1.- Albercht, R.: Development of antibacterial agents of the nalidixic acid type. *Prog. Drug Res.* 21: 99-104 (1977).
- 2.- Al-Orainey, I.O., Bashandi, A.M., Saeed, E.N.S.: Failure of ciprofloxacin to eradicate brucellosis in experimental animals. *J. Chem.* 2: 380-383 (1990).
- 3.- Bennet, J. B., Brodie, J.L., Benner, E. J. and Kirby, W. M.: Simplified accurate method for antibiotic assay. Clinical specimens. *Amer. Soc. of Microb.* 14: 170-177. (1966).
- 4.- Bergan, T.: Quinolones In: *Antimicrobial Annual 2. Elsevier, Amsterdam, Holland, 1987.*
- 5.- Booth, N.H., Mc Donald, L. E.: *Farmacología y Terapéutica Veterinaria. Vol. I y II. Editorial Acribia, S.A. España 1988.*
- 6.- Chin, N. X., New, H. C.: Ciprofloxacin, a quinolone carboxilic acid, compared with those of norfloxacin, new β lactams, aminoglycosides, and trimethoprim. *Antimic. Agents Chem.* 25: 319-326 (1984).
- 7.- Chu, D. T. W., Fernandes, P.B. and Pemet, A.G.: Synthesis and biological activity of benzothiazolo (3,2-9) quinolone antibacterial agent. *J. Med Chem.* 29: 1531-1534 (1986).
- 8.- Chu, D. T. W., Fernandes, P. B.: Structure activity relationships of the fluoroquinolones. *Antimic. Agents Chem.* 33: 131-135 (1989).
- 9.- Crumplin, G.C., Kenwright, P., Hirst, T.: Investigation into the mechanism of action of the antibacterial agent norfloxacin. *J. Antimic. Agents Chem.*, 8: 251-261 (1975).
- 10.- Domagala, J. M., Hanna, L. D., Helfetz, C. L., Huff, M.P., Mich, T. F., Sanchez, M.: Antibacterials using the target enzyme. The development of a DNA gyrase assay. *J. Med. Chem.* 29: 394-404 (1986).
- 11.- Du Souch, P.: *Métodos en Farmacología Clínica. Organización Mundial de la Salud. México 1992.*
- 12.- Gargallo, D., Moros, M., Coll, R., Esteve, M., Pares, J., Xicota, M. A., Gumes, J.: Activity of E-3846, a new fluoroquinolone and in experimental cystitis and phielonephritis in rats. *Antimic. Agents. Chem.* 39 : 636-641(1988).

- 13.- Goodman, G. A., Rall, W. T.; Nies, S.A.; Taylor, P.: The pharmacological basics of therapeutics. *Editorial Médica Panamericana*. México 1993.
- 14.- Hannan, P. C. T., Goodwin, R. F. W.: Treatment of experimental enzootic pneumonia of the pig by norfloxacin or its 6- chloro analoge. *Res. Vet. Sci.* 49: 202-211 (1989).
- 15.- Ito, A., Hirai, K., Inove, M., Koga, H., Suzue, S., Irikure, T., Mishahushi, S.: *In vitro* antibacterial activity of AM-715 a new nalidixic acid analogue. *Antimic. Agents. Chem.* 17: 103-108 (1980).
- 16.- King, A., Shanon, K., Phillips, I.: The *in vitro* activity of ciprofloxacin compared with that of norfloxacin and nalidixic acid. *J. Antimic. Chem.* 13: 325-331 (1984).
- 17.- Kûng, K. J., Rioud, L., Wolffram, S. and Wanner, M. Comparison of an HPLC and bioassay method to determine antimicrobial concentrations after intravenous and oral administration of enrofloxacin in four dogs. *Res. in Vet. Sc.* 54 : 247-248 (1983).
- 18.- Leysen, D.C. Haemers, A.Ñ and Pattyn, S. R. Mycobacteria and the new quinolones. *Antimic. Agents Chem.* 33, 1-5 (1989).
- 19.- Miyamoto, T., Matsumoto, J., Chiba, K., Egawa, h., Shibamori, K., Minamida, A., Nishimura, Y., Okada, H., Katoaka, M., Fujita, M., Hirose, T., Nakano, J.: Synthesis and structure-activity relationships of 5 substituted 6,8 potency. *J. Med. Chem.* 33: 1645-1656 (1990).
- 20.- Nows, J. F. M., Mevius, D. J., Vree, T. B., Baars, A. M., Laurensen.: ciprofloxacin following intravenous and oral administration to calves and pigs. *Vet. Q.* 10: 156-163 (1988).
- 21.- Prescott J F., Baggot J.D.: *Terapéutica antimicrobiana Veterinaria. Editorial Acribia. Zaragoza España.* 1991.
- 22.- Prescott, J. F., Yielding, K. M.: *In vitro* susceptibility of selected veterinary (1990).
- 23.- Smith, C. M., Reynard, A. M.: *Farmacología. Ed. Med. Panam. España* 1993.
- 24.- Sumano, L.H.: Quinolonas y fluoroquinolonas en medicina veterinaria. *Vet Méx.* 24: 83-92 (1993).

25.- Sumano.L.H., Ocampo.L.C.: *Farmacología Veterinaria. Mc.Graw Hill. México, 1992.*

26.- Vancustem, P.M., Babish, J.G. & Schwark, W. S.: The fluoroquinolone antimicrobials: structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity. *Cornell Veterinarian*. 80, 173-186 (1990).

27.- Wolfson, J. S., and Hooper, D. C. Norfloxacin: a new targeted fluoroquinolone antimicrobial agent. *Ann.Intern. Med.*, 10:238-251 (1988).

Cuadro 1. Variables farmacocinéticas.

AUC ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$)
AUMC ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$)
Vdc(l/kg)
Vd área(l/kg)
Vdes(l/kg)
 α (hr^{-1})
 β (hr^{-1})
 $T_{1/2} \alpha$ (hr)
 $T_{1/2} \beta$ (hr)
 Cl_B (ml/ min/kg)
 Cp_0 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
A($\mu\text{g}/\text{ml}$)
B ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
 K_{12} (hr^{-1})
 K_{21} (hr^{-1})
 K_{10} (hr^{-1})

AUC= área bajo la curva; AUMC= momento-área bajo la curva;Vdc= volumen de distribución central; Vd área= volumen de distribución aparente de la fase de postdistribución; Vdes= volumen de distribución en el estado estable; ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$) α y β = constantes de distribución y postdistribución; $T_{1/2} \alpha$ = vida media de la fase de distribución; $T_{1/2} \beta$ = vida media de la fase de postdistribución; Cl_B = depuración sanguínea; Cp_0 = concentración teórica máxima en el momento cero; A= extrapolación al tiempo cero de la fase de distribución; B= extrapolación al tiempo cero de la fase de eliminación o de postdistribución; K_{12} = constante de difusión fuera del compartimiento central; K_{21} = constante de difusión del compartimiento periférico al central; K_{10} = constante de eliminación.

Cuadro 2. Concentraciones plasmáticas de CQEPCA en perros después de la administración intravenosa de 3 mg/kg del fármaco.

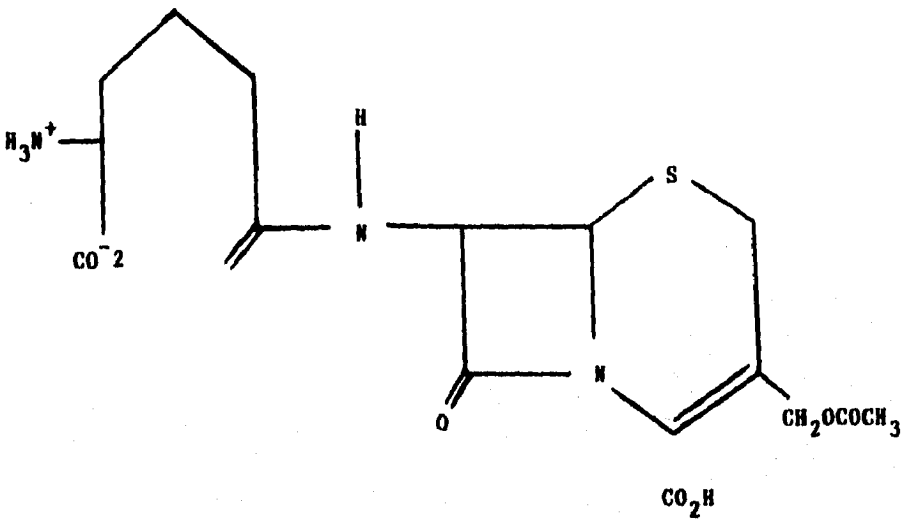
Perro/ Tiempo	1	2	3	4	5	6	7	8	X ± DE
1	0.2	0.1	0.4	0.5	0.7	0.3	0.2	0.3	0.3 ± 0.17
2	0.1	0.09	0.2	0.6	0.3	0.1	0.07	0.2	0.2 ± 0.16
3	0.09	0.06	0.07	0.2	0.1	0.08	0.07	0.1	0.1 ± 0.04
4	0.08	0.05	0.06	0.1	0.09	0.05	0.05	0.08	0.07 ± 0.018
5	0.04	0.02	0.03	0.06	0.06	0.03	0.03	0.05	0.04 ± 0.014
6	0.03	0.009	0.05	0.04	0.02	0.01	0.03	0.009	0.01 ± 0.014
7	0.01	0.008	0.007	0.04	0.03	0.009	0.009	0.01	0.01 ± 0.011
8	0.006	0.005	0.003	0.01	0.01	0.002	0.004	0.008	0.006 ± 0.002

Cuadro 3. Variables farmacocinéticas.

Variable farmacocinética	Media (s.d.)
AUC ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$)	0.047 \pm 0.005
AUMC ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$)	0.046 \pm 0.007
Vdc(l/kg)	25 \pm 7
Vd area(l/kg)	3.64 \pm 0.87
Vdss(l/kg)	4.03 \pm 0.92
α (hr^{-1})	3.50 \pm 0.56
β (hr^{-1})	0.46 \pm 0.21
T $\frac{1}{2}$ α (hr)	0.11 \pm 0.08
T $\frac{1}{2}$ β (hr)	0.06 \pm 0.008
Cl _B (ml/ min/kg)	0.20 \pm 11
Cp ₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	1.90 \pm 0.23
A($\mu\text{g}/\text{ml}$)	65 \pm 3
B ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0.120 \pm 0.005
K ₁₂ (hr^{-1})	0.82 \pm 0.05
K ₂₁ (hr^{-1})	0.55 \pm 0.03
K ₁₀ (hr^{-1})	2.45 \pm 0.57

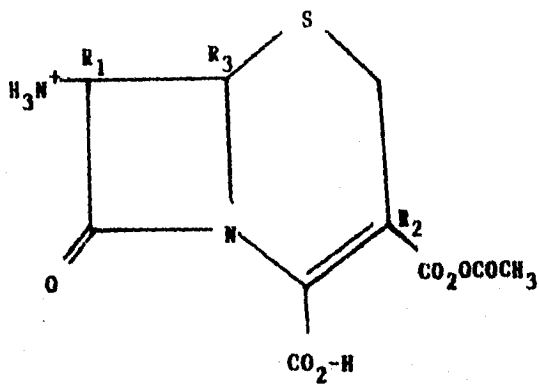
AUC= área bajo la curva; AUMC= momento-área bajo la curva;Vdc= volumen de distribución central; Vd área= volumen de distribución aparente de la fase de postdistribución; Vdss= volumen de distribución en el estado estable; ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$) α y β = constantes de distribución y postdistribución; T $\frac{1}{2}$ α = vida media de la fase de distribución; T $\frac{1}{2}$ β = vida media de la fase de postdistribución; Cl_B = depuración sanguínea; Cp₀ = concentración teórica máxima en el momento cero; A= extrapolación al tiempo cero de la fase de distribución; B= extrapolación al tiempo cero de la fase de eliminación o de postdistribución; K₁₂ = constante de difusión fuera del compartimiento central; K₂₁ = constante de difusión del compartimiento periférico al central; K₁₀ = constante de eliminación.

FIGURA 1



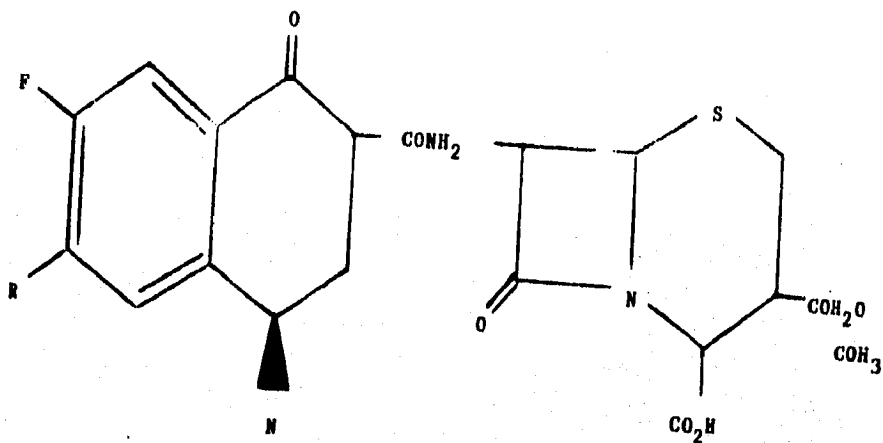
"CEFALOSPORINA C"

FIGURA 2



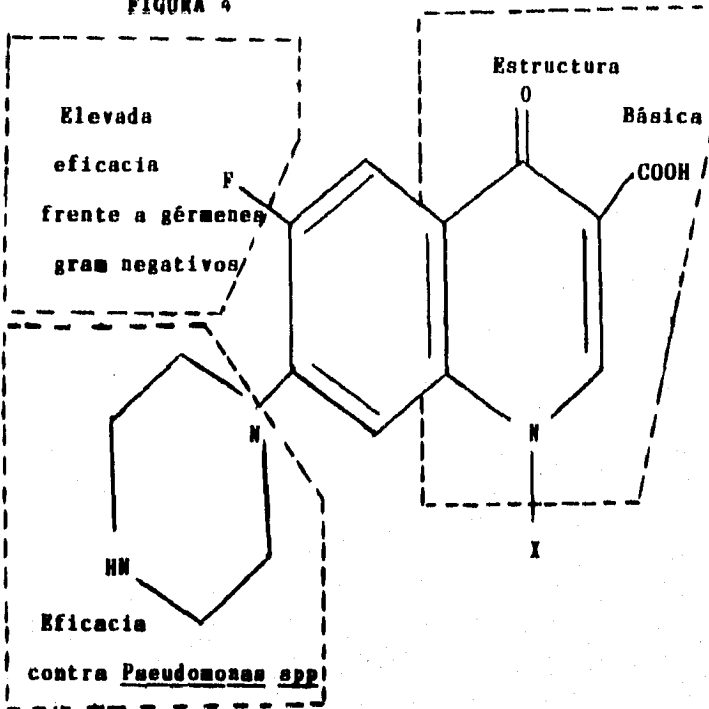
COMPUESTO DENOMINADO "7 ACA"

FIGURA 3



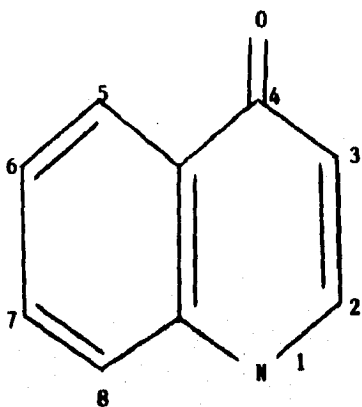
FORMULA ESTRUCTURAL DE LA CEFALOQUINOLONA (CQEPGA)

FIGURA 4



ESTRUCTURA BÁSICA DE LAS FLUOROQUINOLONAS

FIGURA 5



NÚCLEO BÁSICO DE LAS QUINOLONAS

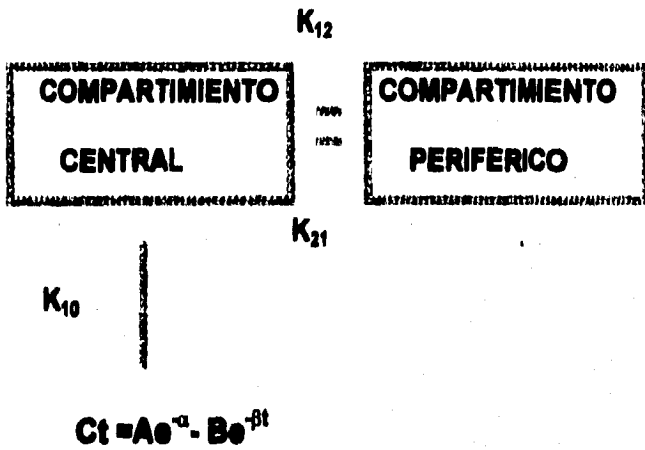


Figura 6. Modelo de dos compartimentos abiertos.

Figura 7. Regresión lineal de la concentración de CQEPCA contra halo de inhibición.

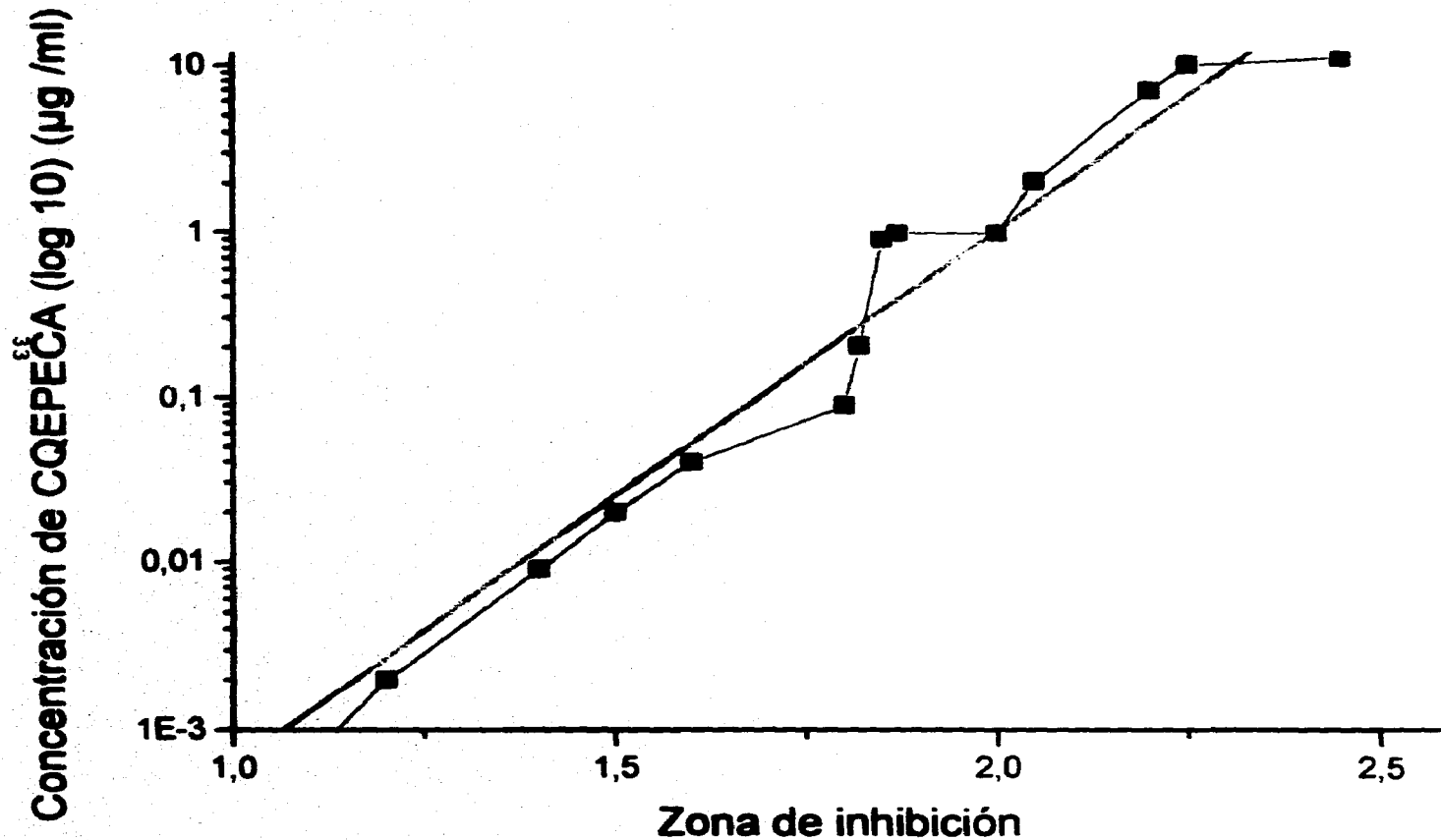


Figura 8. Relación semilogarítmica de la concentración de la CQEPCA en tiempo

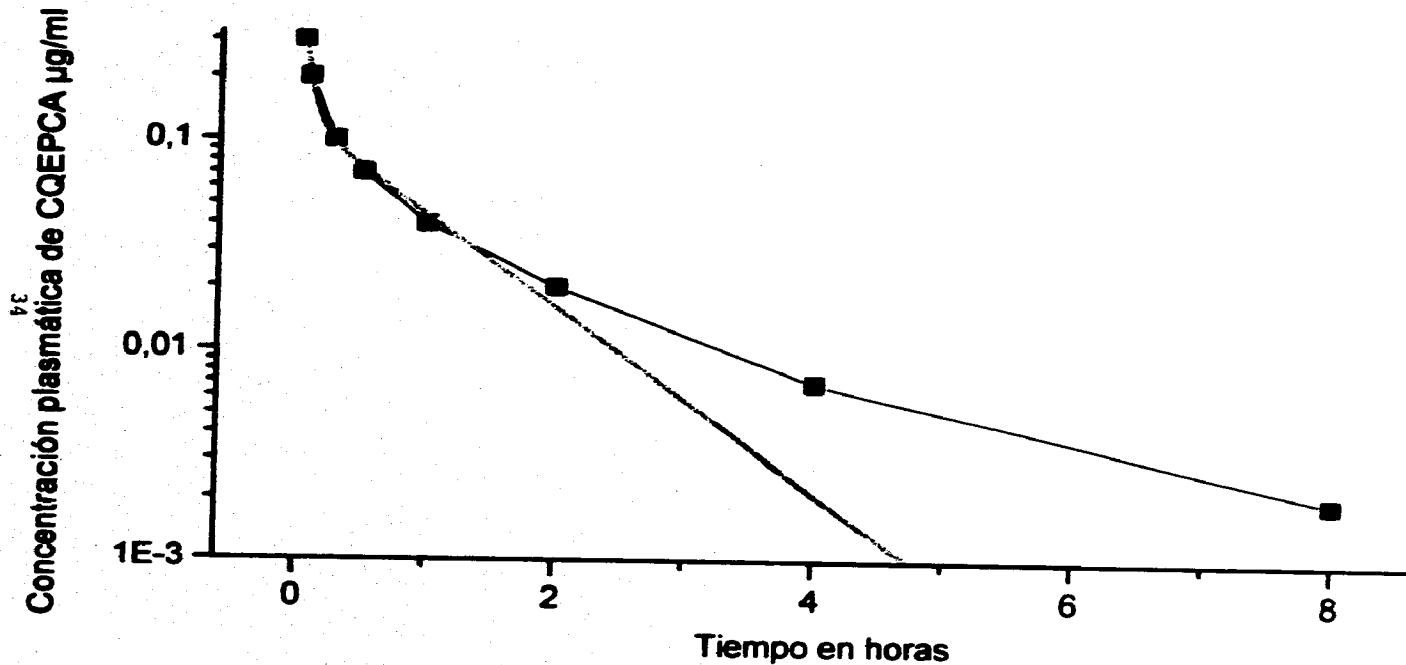


Figura 9. Concentraciones plasmáticas medias y desviaciones estandar de CQEPCA en perros, después de la aplicación intravenosa.

