



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**DETERMINACIÓN DE VALORES FARMACOCINÉTICOS DE  
DOXICICLINA DE LARGA ACCIÓN (DOX-h-LA) POR VÍA  
SUBCUTÁNEA EN PERROS CLÍNICAMENTE SANOS  
Y SU MODELAJE PK/PD.**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

**ZAZIL-HA VELASCO HERRERA**

TUTOR: **DR. HÉCTOR SALVADOR SUMANO LÓPEZ**

COMITÉ TUTORAL: **DRA. LILIA GUTIÉRREZ OLVERA  
DR. JUAN CARLOS VÁZQUEZ CHAGOYAN**

México D.F

2012

## RESUMEN

Se examinó un preparado experimental inyectable de larga acción en perros, elaborado a base de hiclato de doxiciclina (DOX-h) constituido en una matriz polimérica de poloxámero, habiendo incluido la doxiciclina en  $\beta$  ciclodextrina. Estudios previos en otras especies indican la posibilidad de obtener concentraciones terapéuticas por al menos 4 días y por ello se postuló como hipótesis del trabajo que este fenómeno observado podría repetirse en perros, pero requería confirmación y definición. Adicionalmente se estableció la vía de administración, el volumen máximo a inyectar, y el sitio de aplicación para evitar la presentación de reacciones locales (fistulaciones, abscesos, etc.) del preparado. El trabajo inicia con éste último punto y se llega a la conclusión que Doxiciclina Hiclato de Larga Acción (DOX-h-LA) aplicada por vía subcutánea con un volumen máximo de 0.3-0.5 mL, por sitio de aplicación en el área de las costillas no induce reacción local adversa únicamente la formación de una masa ocupativa de origen no inflamatorio, desplazable e indoloro que desaparece a los 30-36 días. Se tiene la percepción al final del estudio que la respuesta en términos del dolor y con los volúmenes referidos puede considerarse no mayor al dolor que inducen otros fármacos de acuerdo a la escala de Melbour. Para definir el intervalo de dosificación se realizaron estudios farmacocinéticos de doxiciclina por 3 vías oral (PO), endovenosa (IV) y la referida para DOX-h-LA por vía subcutánea (SC). El preparado experimental inyectable mostró valores de biodisponibilidad (199,48%), una Concentración Máxima en Suero ( $C_{max}$ ) de  $2.8 \pm 0.3$ , con un tiempo para alcanzar la  $C_{max}$  ( $T_{max}$ ) de  $2.11 \pm 0.12$  h y una vida media de eliminación ( $T_{1/2\beta}$ ) de  $133,61 \pm 6,32$  h que sugiere la existencia de una cinética de "flip-flop". Considerando las concentraciones mínimas inhibitorias en suero (CMI) asentadas en la literatura para patógenos sensibles para la doxiciclina de 0.1-0,5  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , los intervalos de dosificación que se proponen en este estudio fluctúan de 5 - 7 días para DOX-h-LA, y sólo 48 y 24 h después de la administración de hiclato de Doxiciclina (DOX-h) por vía PO e IV en forma de comprimidos, o como solución respectivamente. Es factible concluir que la relación PK/PD de la

Doxiciclina se ha optimizado con el preparado experimental inyectable descrito en este trabajo.

Palabras claves: Farmacocinética, Doxiciclina, perros

## **ABSTRACT**

Based on its PK/PD ratios, doxycycline hyclate (DOX-h), a time-dependant antibacterial, is ideally expected to achieve both sustained plasma drug concentrations at or slightly above the MIC level for as long as possible between dosing intervals. Pursuing this end, a poloxamer-based matrix was used to produce a long-acting injectable preparation (DOX-h-LA) and its serum concentrations vs. time profile investigated after its SC injection to dogs ( $\leq 0.3$  mL per injection site), and results compared with the oral (PO) and IV pharmacokinetics of DOX-h, prepared as tablet or as freshly made solution. A crossover (4 x 4 x 4) study design was employed with 12 Mongrel dogs, with washout periods of 21 days, and at dose of 10 mg/kg in all cases. DOX-h-LA showed the greatest values for bioavailability (199.48%); maximum serum concentration ( $C_{max}$ ) value was  $2.8 \pm 0.3$  with a time to reach  $C_{max}$  ( $T_{max}$ ) of  $2.11 \pm 0.12$  h and an elimination half-life of  $133.61 \pm 6.32$  h. Considering minimum effective serum concentration of  $0.5 \mu\text{g/mL}$ , a dose-interval of at least 1 week h can be achieved for DOX-h-LA, and only 48 h and 24 h after the IV or PO administration of DOX-h as a solution or as tablets, respectively. A non-painful small bulge, apparently non-inflammatory could be distinguished at injection sites. These lumps dissipated completely in 30 days in all cases.

Keywords: Pharmacokinetic, Doxycycline, dogs.

# CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	3
2.1 TETRACICLINA	9
2.2 HICLATO DE DOXICICLINA ( DOX-H)	10
2.2.1 DATOS GENERALES	10
2.2.2 ACTIVIDAD MICROBIANA	11
2.2.3 FARMACODINAMIA	12
2.2.4 RESISTENCIA	13
2.2.5 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS	13
2.2.6 FARMACOCINÉTICA	15
2.2.7 ABSORCIÓN	16
2.2.8 DISTRIBUCIÓN	16
2.2.9 BIOTRANSFORMACIÓN Y EXCRECIÓN	17
2.2.10 TOXICIDAD Y EFECTOS ADVERSOS	18
2.3 DIFERENTES DOSIS DE DOXICICLINA EN PERROS	19
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	20
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b>	23
<b>5. HIPÓTESIS</b>	25
<b>6. OBJETIVOS</b>	25
6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	26

7.1 LUGAR DONDE SE LLEVO ACABO EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	26
7.2 GRUPO EXPERIMENTAL	27
7.2.1 EXAMEN CLINICO	28
7.2.2 MANEJO	28
7.2.3 HEMOGRAMA Y QUÍMICA SANGUÍNEA	28
7.2.4 ALOJAMIENTO Y ALIMENTACIÓN	29
7.3 DETERMINACIÓN DEL SITIO IDÓNEO DE ADMINISTRACIÓN DEL PREPARADO EXPERIMENTAL INYECTABLE	29
FASE I	29
FASE II	29
FASE III	31
FASE IV	32
7.4 DETERMINACION DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA VS. TIEMPO DE LA DOXICICLINA MEDIANTE UNA MODIFICACIÓN DE UN MÉTODO MICROBIOLÓGICO, POSTERIOR A LA ADMINISTRACIÓN DE DOX-H LA POR VÍA SC, SOLUCION ACUOSA DE DOXICICLINA POR VÍA IV Y POR VÍA PO DESPUES DE LA ADMINISTRACION ORAL DE TABLETAS DE HICLATO DE DOXICICLINA EN PERROS CLÍNICAMENTE SANOS.	32
7.5 OBTENCION DE MUESTRAS SANGUÍNEAS PARA SU PROCESAMIENTO DESPUES DE SU APLICACION POR LAS DIFERENTES VIAS ( SC,PO,IV) DE DOX-h-LA, DOX-H Y DOXICICLINA EN SOLUCION ACUOSA.	37
7.6 DETERMINACION DE LOS VALORES FARMACOCINÉTICOS DE LA DOXICICLINA MEDIANTE POSTERIOR A LA ADMINISTRACIÓN SC, IV Y VO DE DOX-H-LA 10 % EN PERROS CLÍNICAMENTE SANOS.	37
7.6.1 ANÁLISIS Y PROCESAMIENTO DE LOS RESULTADOS.	37

<b>8 RESULTADOS</b>	40
8.1 DETERMINACION DEL SITIO IDONEO DE ADMINISTRACION DEL PREPARADO EXPERIMENTAL INYECTABLE	40
8.2 DETERMINACION DEL VOLUMEN MAXIMO DE ADMINISTRACION DEL PREPARADO EXPERIMENTAL INYECTABLE.	41
8.3 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION PLASMÁTICA VS. TIEMPO DE LA DOXICICLINA MEDIANTE UNA MODIFICACION DE UN METODO MICROBIOLÓGICO, POSTERIOR A LA ADMINISTRACION SC, IV Y VO DE DOX-H-LA 10 % EN PERROS CLÍNICAMENTE SANOS.	41
8.4 GRAFICAS CON LOS RESULTADOS FARMACOCINÉTICOS	45
8.4.1 VALORES FARMACOCINÉTICOS DE LA PRUEBA SE MUESTRAN EN LA FIGURA 5 CON LA CURVA ESTÁNDAR DE LA DOXICICLINA Y SU LÍMITE DE DETECCIÓN.	45
8.4.2 RESULTADOS FARMACOCINÉTICOS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACION SC DEL PREPARADO EXPERIMENTAL DOXICICLINA HICLATO DE LARGA ACCION (DOX-h-LA EN HEMBRAS CLINICAMENTE SANAS).	46
8.4.3 RESULTADOS FARMACOCINÉTICOS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACION SC DEL PREPARADO EXPERIMENTAL DOXICICLINA HICLATO DE LARGA ACCION (DOX-h-LA EN PERROS CLINICAMENTE SANOS).	47
8.4.4 GRÁFICA PROMEDIO DE DOX-H-LA POR VÍA SUBCUTÁNEA	48
8.4.5 RESULTADOS FARMACOCINÉTICOS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACION IV DE UNA SOLUCION ACUOSA DE HICLATO DE DOXICICLINA EN PERRAS CLINICAMENTE SANAS.	49
8.4.6 RESULTADOS FARMACOCINÉTICOS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACION IV DE UNA SOLUCION ACUOSA	50

DE HICLATO DE DOXICICLINA EN PERROS CLINICAMENTE SANOS.	
8.4.7 GRAFICA CON LOS PROMEDIOS FARMACOCINÉTICOS, EN PERROS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN IV.	51
8.4.8 RESULTADOS FARMACOCINÉTICOS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN PO DE UNA SOLUCION ACUOSA DE HICLATO DE DOXICICLINA EN PERRAS CLINICAMENTE SANAS.	52
8.4.9 RESULTADOS FARMACOCINÉTICOS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN PO DE UNA SOLUCION ACUOSA DE HICLATO DE DOXICICLINA EN PERROS CLINICAMENTE SANOS.	53
8.4.10 PROMEDIOS FARMACOCINÉTICOS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN PO DE UNA SOLUCION ACUOSA DE HICLATO DE DOXICICLINA EN PERROS CLINICAMENTE SANOS.	54
8.4.11 RESULTADOS FARMACOCINÉTICOS, EN PERROS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE LOS PREPARADOS DE HICLATO DE DOXICICLINA Y DEL PREPARADO EXPERIMENTAL DOXICICLINA HICLATO DE LARGA ACCION (DOX-h-LA)	55
8.5 VALORES FARMACOCINÉTICOS	56
<b>9. DISCUSIÓN</b>	<b>57</b>
<b>10 . CONCLUSIONES</b>	<b>59</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>60</b>

## 1. INTRODUCCION

Doxiciclina es un derivado semisintético de la oxitetraciclina, de amplio espectro, se utiliza comúnmente como hiclato de doxiciclina (DOX-h). Se diferencia de la oxitetraciclina, clortetraciclina y la tetraciclina en que es 5-10 veces más lipófilo;<sup>1</sup> por tanto, posee mayor penetración en el tejido, mayor volumen de distribución y mejores propiedades antimicrobianas. Además, presenta una mayor unión a proteínas plasmáticas y una prolongada vida media,<sup>2</sup> tanto en los seres humanos y animales. El efecto antimicrobiano de DOX-h se basa en obstaculizar la síntesis de proteínas bacterianas, por la interferencia con la unión de aminoacil-tRNA al complejo ARNm al ribosoma para detener el crecimiento.<sup>3,4</sup> Este mecanismo de acción se ha relacionado con óptimos resultados clínicos cuando el fármaco se administra para cumplir con una acción en función del tiempo.<sup>5,6</sup> Es decir, idealmente, las concentraciones séricas de Doxiciclina nunca debe estar por debajo del MIC en cualquier momento durante el intervalo de dosificación.<sup>6</sup> En los perros, ha sido catalogada como fármaco de elección para el tratamiento de infecciones bacterianas causadas por: *Haemobartonella spp*, *Streptococcus spp*, *Haemophilus spp*, *Bordetella bronchiseptica*, *Mycoplasma spp*, *Leptospira spp*, *Erclichia canis*, *Rickettsias*, *Borrelia burgdorferi*, *Brucella canis*, *Campylobacter jejuni*, *Fusobacterium spp*.<sup>7,8,9,79-85</sup> Para tratar las enfermedades causadas por estas bacterias, es habitual administrarla en forma de comprimidos 1 o 2 veces al día. Sin embargo, el cumplimiento de la dosificación a largo plazo es a menudo defectuosa, ya sea por negligencia o por los efectos secundarios del medicamento como vómitos y otras reacciones gastrointestinales adversas.<sup>2</sup> La inyección de una preparación acuosa de DOX-hiclato no es una opción porque, como ocurre con otras tetraciclinas, esta droga es muy irritante del tejido.<sup>10,11</sup> Una posible excepción puede

encontrarse en la formulación experimental de acción prolongada de doxiciclina que se ha propuesto para las vacas <sup>12</sup> y cabras en el 2008 (DOX-h-LA).<sup>13</sup> Teniendo en cuenta lo anterior, los objetivos de este estudio fueron: establecer la farmacocinética en perros del preparado experimental inyectable de DOX-h-LA después de su administración subcutánea en una dosis de 10 mg / kg y comparar los resultados con la farmacocinética de DOX-h después de su administración oral en tabletas y la inyección IV de una solución acuosa de hclato de doxiciclina recién hecha.

## 2. ANTECEDENTES

La mayoría de los antibióticos introducidos en la clínica para el tratamiento de las infecciones bacterianas en los últimos 50 años, han sido productos naturales producidos por bacterias del grupo de los actinomicetos; con su aparición, desarrollo farmacéutico y el uso en medicina veterinaria y humana se genera una de las medidas más importantes para el tratamiento y control de las infecciones bacterianas en el siglo XX.<sup>14</sup>

Actualmente el uso indiscriminado de los antibacterianos para el control o eliminación de las enfermedades ha propiciado el desarrollo de fenómenos de resistencia bacteriana reduciendo o anulando su eficacia clínica.<sup>6,15,16</sup> Aunque se ha pretendido limitar su uso para retardar la aparición de resistencias, poco se ha logrado, ya que según Burns<sup>17</sup> y Heinemann *et al.*<sup>18</sup> un antibiótico no induce resistencia, solamente selecciona. En este proceso se lleva a cabo una selección de las bacterias más aptas para la supervivencia en el sitio del organismo del que se trate, en presencia del antibacteriano, sobrevivirán solamente aquellas variantes capaces de resistir concentraciones de antibiótico presentes en ese lugar. Sin embargo es claro pensar, que el uso racional de los antibióticos, es el factor más decisivo para abatir la tasa de aparición de resistencias y con ello prolongar el éxito en la terapia antimicrobiana o la vida útil de un fármaco.

Evidentemente, las dosis deben ser las adecuadas para cada especie; se debería cumplir con el intervalo de dosificación de la manera más idónea y la duración del tratamiento debe ser la apropiadas para el perfil farmacocinético/farmacodinámico (PK/PD) que presenta cada principio activo.<sup>19</sup> Además, se debería evitar el uso indiscriminado y deberá existir congruencia entre las concentraciones de los antimicrobianos (parámetro farmacocinético)

y el modo de actuar junto con los valores de la Concentración Mínima Inhibitoria (parámetro farmacodinámico).

Este concepto de PK/PD es actualmente considerado fundamental por la comunidad médica para optimizar el uso de antimicrobianos pues permite asegurar que la dosis y el intervalo de dosificación seleccionados tengan congruencia con la manera de actuar del fármaco, con su CMI y distribución. Esto permite garantizar la eficacia en los estudios de farmacología clínica de los antimicrobianos, desde sus primeras fases.<sup>20</sup>

Con la aparición de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos, a mediados de la década de los 80 comenzaron a incorporarse nuevas moléculas, unas de nueva síntesis, otras por modificación de las ya existentes y combinando los fármacos o a rediseñarlos.<sup>17-20</sup> tendencia que ha continuado y probablemente seguirá. No obstante, en las últimas tres décadas, los éxitos emanados de la investigación de nuevos antibacterianos ha disminuido notablemente debido a diversos factores como: la introducción de reglamentaciones aun más estrictas por las que son sometidos los nuevos medicamentos, aumentado así la duración de las tareas de investigación y por una creciente dificultad para investigar nuevos principios activos y los consecuentes cambios en los campos terapéuticos explorados por la industria y en la metodología utilizada en la investigación,<sup>21-24</sup> estos dos factores provocan un incremento en los costos. Un ejemplo claro es en el período de 1960 a 1980 donde se estimó que el costo para generar un nuevo fármaco se había elevado 20 veces<sup>I</sup> para

---

<sup>I</sup>E Instituto nacional Estadística, Geografía e Informática. INEGI. <http://degenesyp.INEGI.gob.mx/cgi.win/bdi.exe> 05/16/03

<sup>F</sup> Cámara Nacional de la Industria Farmacéutica <http://www.canifarma.org.mx> 05/04/10

<sup>G</sup> Food and Drug Administration. FDA. <http://www.fda.gov/eder/handbook> 13/01/09

mediados de 1985, la inversión ascendía a 150 000 000 de dólares y para el 2000 hasta 265 000 000 de dólares. Por otro lado, antes de 1962 un programa típico de investigación requería de 2 a 3 años y para el 2000 se requirió un promedio de 7-10 años<sup>F</sup> y con un elevado riesgo científico y financiero, ya que aunque un antimicrobiano tuviera una excelente actividad biocida tendrá que ser inocuo para el medio ambiente, demostrar que no tiene efecto mutagénico, carcinogénico, genotóxico, teratogénico ni embriotóxico.<sup>G,25,26</sup>

En contraste, en América Latina se ha recurrido a la adopción de medicamentos que han resultado útiles en otra especie, sin llevar a cabo las pruebas necesarias para su adaptación farmacológica, su aprobación en cuanto a seguridad y efectividad. Esta situación unida a la resistencia bacteriana provoca a corto plazo una falta total de tratamientos eficaces contra algunos agentes patógenos. En veterinaria no es suficiente extrapolar los preparados comerciales de los seres humanos o incluso de otras especies, por lo que en la actualidad, está siendo blanco de las regulaciones de la Comunidad Europea (EMEA) y Estados Unidos (FDA).

La FDA hace énfasis en la falta de estudios de biodisponibilidad (F) de muchos antibacterianos de uso común en medicina veterinaria; pondera que las dosificaciones parenterales no pueden ser extrapoladas entre especies, ya que las variaciones de absorción, distribución, biotransformación y excreción llegan a diferir enormemente aun dentro de los mismos individuos de la especie.

Dada la escasa redituabilidad de las investigaciones encaminadas a encontrar nuevas familias de antimicrobianos, actualmente existe la tendencia natural a explorar el diseño de nuevas formas farmacéuticas a fin de optimizar la eficacia de moléculas disponibles en el

mercado.<sup>27</sup> Este impacto se ha hecho extensivo a la industria farmacéutica y en muchos casos ha sustituido sus formas farmacéuticas convencionales (comprimidos, jarabes, suspensiones, etc.), la cual está integrando dinámicamente el uso de Sistemas de Liberación Controlada (SLC: Cualquier preparación farmacéutica cuya velocidad de liberación de la sustancia activa sea diferente a aquella de una forma farmacéutica convencional destinada a la misma vía) dentro de sus estrategias de desarrollo y haciendo congruente la relación de su comportamiento PK/PD ( Farmacocinético/Farmacodinámico) mediante el uso de excipientes que modifiquen la liberación y/o absorción del fármaco. En la Clínica Veterinaria la tendencia obligada de la investigación, en el caso de antibacterianos dependientes del tiempo, es el uso de formulaciones cuya administración permita mantener concentraciones terapéuticas del antibiótico durante periodos prolongados. Tal es el caso de tetraciclinas, macrólidos y  $\beta$ -lactámicos. En la práctica de pequeñas especies, el uso del preparado de larga acción facilita completar en tiempo y forma , los esquemas de tratamiento y se desliga un poco el quehacer médico de la idiosincrasia de los dueños de perros y gatos.<sup>33</sup> Por su parte para los propietarios es a veces más fácil llevar al médico veterinario 1 vez cada 7 días en lugar de administrar un medicamento una o dos veces al día. El éxito de los SLC está basado en los evidentes beneficios económicos, terapéuticos y sociales que hace que los sistemas elaborados con esta tecnología gocen de un “valor agregado”. La liberación prolongada (LP) tiene grandes ventajas frente a las formulaciones convencionales, dentro de las que se podrían mencionar la reducción de efectos adversos, disminución del estrés por el manejo, disminución de los costos por manejo, terapias antibacterianas adecuadas en tiempo y concentraciones, mejora de la actividad terapéutica de las sales existentes y disminución de la presentación de resistencias bacterianas , algunas de las desventajas de los preparados LP incluyen: El conocimiento del sitio de absorción,

potencial presencia de residuos tisulares, reacciones en tejidos, inyectabilidad del producto y su retención en el sitio de aplicación, estabilidad del producto y procesos de manufactura.

En medicina humana como en veterinaria, se han introducido preparados farmacéuticos con características de liberación modificada, a fin de adecuar la farmacocinética del principio activo y optimizar la biodisponibilidad. Se ha tratado de incorporar grupos funcionales a los principios activos, que le den especificidad, mejoren su solubilidad y estabilidad y favorezcan su llegada al sitio de acción, sin comprometer la eficacia del tratamiento. Esto agrega otra dimensión a las funciones tradicionales del preparado como simple vehículo para el almacenamiento, el transporte y la administración y la dosificación de un fármaco.<sup>28,29</sup> La efectividad terapéutica de muchos medicamentos disminuye por su imposibilidad para llegar en concentraciones adecuadas al lugar de acción, esto puede deberse a su baja solubilidad o a su inactivación por enzimas y fluidos corporales.<sup>30,31</sup> Por ejemplo: en fármacos de intervalos de dosificación a corto plazo se podría optimizar el manejo de obra si el diseño farmacéutico de los antibióticos se ajustara, no solo a la farmacocinética de estas especies, sino a sus sistemas habituales de manejo.

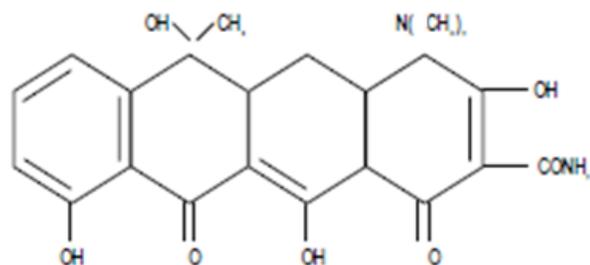
Finalmente cabe resaltar que las formulaciones parenterales de liberación controlada son actualmente una atractiva opción terapéutica en el área veterinaria ya que reducen el manejo de los animales y proporcionan un adecuado control terapéutico de las infecciones bacterianas, ajustándose a las propiedades farmacocinéticas, por esta razón, a nivel mundial están tratando de desarrollar formulaciones de liberación prolongada (LP) de diversos antibacterianos de utilidad veterinaria para dar una mejor opción terapéutica. Ejemplos de esta tecnología, son las tetraciclinas, las cuales son un grupo de antimicrobianos más utilizados en la Medicina Veterinaria, desde 1953 y hasta la fecha.<sup>32,33</sup> En particular la

forma inyectable de oxitetraciclina es uno de los pocos ejemplos de diseño farmacológico para uso exclusivo en la medicina veterinaria.<sup>33</sup> El preparado más antiguo es considerado uno de los medicamentos pioneros de LP, y dicho efecto se logra por un vehículo a base de 2- pirrolidona y una pequeña proporción de propilenglicol.<sup>34,35</sup> Vehículos que moderan el efecto irritativo de la oxitetraciclina al tiempo en que le permiten su liberación sostenida para generar concentraciones plasmáticas útiles hasta por 120 horas.<sup>36,37</sup> El éxito clínico de este preparado fue notable y se debió no solamente a la potencia antimicrobiana de la oxitetraciclina sino también a que se ha detectado que este antibiótico es más “tiempo dependiente” que “concentración dependiente”, cuando se cuantifica su eficacia clínica.

## 2.1 TETRACICLINAS

A finales de la década de los años cuarenta, se desarrolló las primeras tetraciclinas obtenidas a partir del microorganismo *Streptomyces aureofaciens* presente en muestras de suelos recogidos en diferentes partes del mundo.<sup>38,39</sup> Los microorganismos de la familia *Streptomyceae* resultaron ser la fuente más abundante de antibióticos utilizables para combatir las enfermedades bacterianas en animales en las últimas décadas. En 1948 apareció el primero de estos compuestos, la clortetraciclina, y se da a conocer 2 años más tarde la oxitetraciclina ( *Streptomyces ryhmosus*). A partir de este momento, se logra la síntesis de nuevas tetraciclinas, en el orden siguiente: tetraciclina, 1952; demeclociclina, 1957; meticiclina, 1961; doxiciclina, 1966; minociclina, 1972 y limeciclina, 1976.<sup>20,38,39</sup> Esta familia de antibióticos se clasifica de acuerdo con cuatro apartados: productos naturales de tetraciclina (clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina), compuestos de segunda generación o compuestos semisintéticos de tetraciclinas (minociclina, doxiciclina, meticiclina), tetraciclinas de tercera generación o glicilciclinas (tigeciclina) y las tetraciclinas químicamente modificadas (CMTs), grupo que comprende al menos diez análogos (CMTs-1 al 10) aún experimentales y no disponibles para la comunidad.<sup>20</sup>

El nombre de tetraciclinas deriva de que su estructura química es tetraciclina. Contiene núcleo central de octahidronaftaceno y una gran variedad de grupos funcionales que se unen a los cuatro anillos de la estructura. La estructura más simple que muestra actividad antimicrobiana es la 6- deoxi-6-dimetiltetraciclina, (Vea figura. 1) el grupo C4 dimetilamino del anillo A confiere las propiedades antibióticas. La modificación química para la eliminación de esta estructura funcional favorece la actividad no antibiótica de estos compuestos y suprime las propiedades antimicrobianas de las tetraciclinas.<sup>20,40</sup>



**Figura 1.** Estructura de las tetraciclinas

Físicamente las tetraciclinas se encuentran en forma de polvo de color amarillo, no tienen olor, son amargas, anfóteras y se destruyen en soluciones alcalinas fuertes y soluciones ácidas (con pH inferior a 2).<sup>41</sup>

## 2.2 HICLATO DE DOXICICLINA ( DOX-h)

### 2.2.1 DATOS GENERALES.

La doxiciclina forma parte del grupo de las tetraciclinas, es un fármaco semisintético derivado de la oxitetraciclina aislada en 1966, aprobada por la FDA (Administración de Alimentos y Drogas) en 1967, como un antibiótico de amplio espectro para su uso en medicina humana y en medicina veterinaria.<sup>40</sup>

Presenta una amplia penetración tisular debido a su gran liposolubilidad lipídica, su espectro antibacteriano es muy amplio, su vida media de eliminación prolongada y su eliminación no depende del riñón.<sup>40-42.</sup>

La doxiciclina es capaz de penetrar las membranas celulares y acceder a los organismos intracelulares presenta propiedades antiinflamatorias e inhibe la matriz metaloproteinasas (MMPs).<sup>20</sup>

### 2.2.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

Posee una acción antibacteriana de amplio espectro, actúa contra bacterias Gram negativas, Gram positivas.<sup>40</sup> En general la doxiciclina es más eficaz contra estreptococos, estafilococos y bacterias anaerobias facultativas.<sup>43-50</sup> Miembros de las enterobacterias son sensibles (*Escherichia coli* y *Vibrio cholerae*), tiene buena actividad contra *Rickettsias*, *Mycoplasmas*, *Chlamydia spp*, *Haemobartonella*, *Nocardia*, *Ehrlichia sp.* espiroquetas y protozoarios.<sup>50-53</sup> Es frecuentemente empleada en infecciones causadas por bacterias que no son susceptibles a los antibióticos comúnmente empleados. Ejemplos de estas infecciones incluyen: infecciones en tracto urinario y el genital, enfermedades del árbol respiratorio, infecciones de transmisión hemática y heridas infectadas.

La doxiciclina en perros se le considera como tratamiento de elección para *Haemobartonella canis*, *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*, *Haemophilus spp*, *Bordetella bronchiseptica*, *Mycoplasma spp*, *Leptospira spp*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi*, *Brucella canis*, *Campylobacter jejuni*, *Fusobacterium spp*, *Rickettsia*, *Anaplasma* y *Chlamydia*.<sup>7,8,9,54-56,79-86</sup>

Las tetraciclinas presentan actividad frente algunas MMPs (metaloproteinasas), inhiben e impiden su producción de las colagenasas tipo I (MMP-1,8 y 13), de gelatinasas (MMP-2 y 9) y de estromielisina I (MMP-3), preferentemente en MMPs de neutrófilos. Las tetraciclinas involucradas en esta acción son las tetraciclinas clásicas, minociclina y doxiciclina.<sup>20</sup> La doxiciclina también presenta propiedades antiinflamatorias, al reducir la producción de citosina y óxido nítrico. A dosis subantimicrobianas, tiene efecto anticolagenolítico por degradación de metaloproteinasas matriciales (MMPs), e inhibe las citocinas inflamatorias.<sup>20</sup> Se ha reportado que mediante este mecanismo reduce la severidad

de la osteoartritis en perros, al inhibir la producción de la matriz de metaloproteinasas (MMPs), a través de dos mecanismos principales: Inhibición de iones de Calcio y Zinc, Inhibición de la procólagenasa de los neutrófilos (MMP-8).<sup>72</sup>

### 2.2.3 FARMACODINAMIA.

La doxiciclina atraviesa directamente por la doble capa de lípidos de los microorganismos por un proceso de transporte pasivo, sin embargo también se requiere de un segundo proceso dependiente de energía que transporta activamente todas las tetraciclinas a través de la membrana citoplasmática interna. Una vez en el interior de la célula bacteriana inhiben la síntesis de proteínas y se ligan a la subunidad 30 S de los ribosomas, impiden el acceso del aminoacil RNAt al sitio aceptor del complejo RNAm-ribosoma, y esto tiene como consecuencia la no adición de aminoácidos a la cadena peptídica en crecimiento. Una característica de este tipo de medicamentos al ser bacteriostáticos, es que el tratamiento puede necesitar periodos prolongados de estancia, por lo que se le debe manejar como un agente tiempo- dependiente.<sup>59,60</sup> Su efecto bacteriostático se da al entorpecer la síntesis proteica deteniendo el crecimiento y/o multiplicación , actuando a nivel del ribosoma bacteriano. En el cuadro 1 se detallan los valores de la CMI que reporta la literatura.

**Cuadro 1**

<b>CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS (µg/mL) DE DOXICICLINA</b>		
Organismo	MIC (µg/mL)	No. De Referencia
<i>Chlamydia trachomatis</i>	0.008 - 0.06 - 0.2 <sup>b</sup>	54,91
<i>Bacillus anthracis</i>	0.025 - 0.1 <sup>b</sup>	3
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.28 <sup>a</sup> - 1 <sup>b</sup>	47, 92
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0.16 <sup>a</sup> - 0.64 <sup>b</sup>	92
<i>Actinomyces pyogenes</i>	0.25 - 2 <sup>b</sup>	47

<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	0.5 - 8 <sup>b</sup>	93
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	0.016-0.25 <sup>a</sup> - 0.5-2 <sup>b</sup>	93,94
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	0.25-0.39 <sup>a</sup> 1.56-2 <sup>b</sup>	51,93
<i>Actinobacillus suis</i>	3.125 <sup>a</sup> 6.25 <sup>b</sup>	95
<i>Pasteurella multocida</i>	0.09-0.78 <sup>a</sup> - 0.2-1.56 <sup>b</sup>	51,92,93
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	0.125-0.25 <sup>a</sup>	96
<i>Brachyspira pilosicoli</i>	0.25-0.5 <sup>a</sup>	49
<i>Enterococcus faecalis</i>	4 <sup>b</sup>	45
<i>Escherichia coli</i>	1.0 <sup>a</sup> - 4 <sup>b</sup>	45,92
<i>Leptospira sp.</i>	0.10 - 3.13 <sup>b</sup>	97
<i>Borrelia sp</i>	0.25-4 <sup>b</sup>	98

a -(MIC<sub>50</sub>)

b - (MIC<sub>90</sub>)

## 2.2.4 RESISTENCIA.

La resistencia a la tetraciclina de algunos microorganismos es mediada por plásmidos (el trasposón Tn 10 ), los cuales codifican para interferir con el transporte activo de la tetraciclina impidiendo su entrada a las células con ello no logran la concentración de la tetraciclina necesaria en el interior de la célula,<sup>61</sup> es un rasgo inducible y transferible, o lo que es lo mismo, las bacterias se hacen resistentes sólo después de expuestas a la droga y son capaces de transmitir esta resistencia a otras bacterias mediante la transferencia plasmídica, por ello la resistencia a la doxiciclina es menos común. No obstante, se ha propuesto que las bacterias llegan a desarrollar pérdida de permeabilidad pasiva hacia la doxiciclina.<sup>3</sup>

## 2.2.5 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS.

**Principio Activo:** Hiclato de Doxiciclina

**Sinónimos:** Clorhidrato de Doxiciclina

**Estructura Molecular:** (C 22 H 24 N2 O8 \* HCL ) 2 \* C2H8O\*H2O

**Denominación química desarrollada** : monohidrato de [4S (4AR, 5S, 5AR, 6R, 12AS)] - 4 - (dimetilamino) -1,4,4 a, 5,5 a, 6, 11,12 a-octahidro-3, 5,10,12,12 pentahidroxi- 6-metil-1, monohidrocloruro 11 deoxonaphtacene-2-carboxamida, compuesto con alcohol etílico (2:1).

**Propiedades Físicas (Aspecto):** Hiclato doxiciclina es una sal cristalina amarilla, higroscópica, se solubiliza en agua y metanol. Se disuelve en soluciones alcalinas de hidróxido y de carbonatos, en solución a 1% en agua tiene un pH de 2, 3. Absorvancia específica de 300 a 335 y la máxima de 349 nm, metales pesados no más de 50 ppm, absorción de luz por impurezas no más de 0.07, anfótera y ácida, que se encuentra como hemihidrato, hemietanolato-clorhidrato de doxiciclina.<sup>40</sup>

**Estabilidad del Principio Activo:** La luz ultravioleta causa oxidación, el agua oxigenada causa oxigenación, en pH menor a 2 y mayor de 8 causa pérdida en la potencia antimicrobiana.

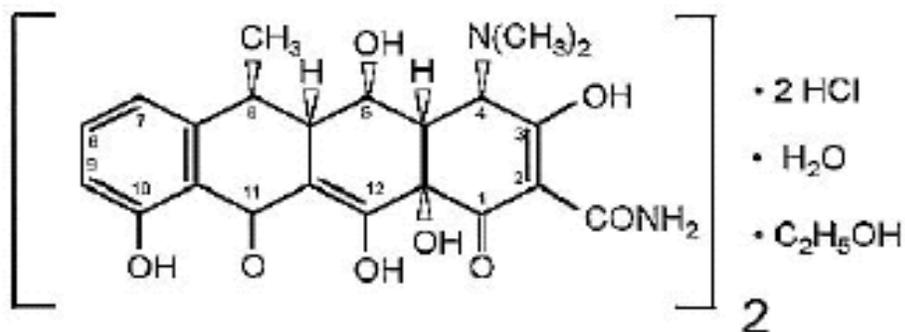
**Incompatibilidades:** Con gases disueltos en agua y soluciones alcalinas.

**Desempeño Biológico:** Su clasificación biofarmacéutica es Clase II- alta permeabilidad y baja solubilidad.

Presenta ciertas ventajas sobre otras tetraciclinas en medicina veterinaria, por ejemplo: tiene una elevada liposolubilidad y por ello presenta una amplia penetración tisular y una baja afinidad para unirse al calcio. La doxiciclina no se degrada a compuestos de tipo epianhidro. Esta característica la hace capaz de atravesar la membrana celular de los microorganismos por un proceso de transporte pasivo que le de acceso al citoplasma. Otras tetraciclinas necesitan de transporte activo relativamente rápido. Sin embargo, es muy

inestable y genera subproductos de oxidación rápidamente. El componente higroscópico en solución acuosa forma fácilmente sales con bases o ácidos.

La doxiciclina posee un peso molecular de 512.9 daltones. En la figura 2 se presenta la fórmula estructural y condensada donde se puede observar que posee grupos ácidos, enoles y fenoles, su fórmula molecular es:  $C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl, \frac{1}{2} C_2H_6O, H_2O \frac{1}{2}$ . Aparentemente el coeficiente de partición de la doxiciclina entre octanol y buffer acuoso (HOH) se presenta en un rango de pH de 2.1-8.5 y su punto isoeléctrico ocurre con pH de 5.6.<sup>62</sup>



**Figura 2.** Estructura química de la doxiciclina

#### 2.2.6 FARMACOCINÉTICA.

La doxiciclina presenta una gran liposolubilidad lipídica característica que la difiere grandemente de otras tetraciclinas, su unión a proteínas plasmáticas en perros es de 91.40%.<sup>52</sup> Estas propiedades incrementan la penetración tisular y prolongan la vida media biológica.<sup>41</sup>

### 2.2.7 ABSORCIÓN.

La doxiciclina puede ser administrada por vía oral, endovenosa o intramuscular, con la desventaja que la administración por la última vía es sumamente dolorosa.<sup>63</sup>

A diferencia de las otras tetraciclinas la doxiciclina parece ser menos susceptible para interaccionar con el calcio<sup>8</sup> y el zinc<sup>8</sup> ya que tiene baja afinidad por estos iones mientras que con el hierro se ha reportado que sí decrece, marcadamente su absorción.<sup>19</sup>

En la administración oral, debido por su gran liposolubilidad, la absorción es muy rápida y completa (93%) y se ve poco afectada por la presencia de comida.<sup>30</sup> El pico de concentración sérica de doxiciclina ocurre entre 1.5 y 3 horas después de su administración.<sup>63,64</sup>

A menudo, al ser administrada la doxiciclina sin alimento y aún con él en algunos casos, se puede presentar efectos colaterales de irritación gástrica y vómito, signos que limitan su eficacia clínica en perros. Además no se puede aplicar IM ni SC como solución simple porque induce necrosis tisular severa.

Como se ha comentado, su penetración a los tejidos es elevada y por ello tiene su volumen aparente de distribución es de los más elevados dentro de las tetraciclinas a excepción de la minociclina. Tiene buena penetración al SNC, mejores propiedades antimicrobianas por baja resistencia y una mayor vida media (15 a 22 h), tanto en seres humanos como en las especies animales en las que ha sido menos estudiada que las oxitetraciclinas naturales.<sup>43</sup>

### 2.2.8 DISTRIBUCIÓN.

La doxiciclina se distribuye ampliamente en el organismo, se ha reportado que después de la administración oral en perro en dosis de 10 mg/kg, el pico de la concentración sérica (4

$\mu\text{g/mL}$ ) fue alcanzado hasta las 2-3 horas y decreció a  $1.5 \mu\text{g/mL}$  después de las 24 horas,<sup>7,5758,65</sup> la vida media biológica en perro se ha reportado de 10- 12 horas. La doxiciclina y la minociclina presentan una amplia penetración al SNC (7-17 % de la concentración sérica), al ojo, a los bronquios y a las glándulas prostáticas.

## 2.2.9 BIOTRANSFORMACIÓN Y EXCRECIÓN.

Bocker en 1981<sup>65</sup> reportó que del 5 % al 10% de la doxiciclina aplicada, se metaboliza en el organismo siendo el principal órgano excretor el intestino. En perros, la excreción urinaria es del 19% , la vía en heces 75% y por bilis menos del 5% respectivamente. En caso de ocurrir una falla renal, se da un incremento compensatorio en la excreción fecal del medicamento, por lo que puede recomendarse como tratamiento en pacientes con falla renal.<sup>75</sup> Las tetraciclina presentan circulación enterohepática.

La vida media de eliminación en perro se ha documentado de 10-12 horas.<sup>65</sup> En perros, la excreción fecal es la mayor ruta de eliminación ya que se elimina con las secreciones gastrointestinales. Según Plumb ,<sup>40</sup> un 18% se excreta a través de las vías biliares, mientras que el resto del fármaco se inactiva en la pared intestinal mediante quelación con iones Ca y Zn que provienen del alimento y posteriormente se difunde hacia el lumen intestinal quedando en su mayor parte inactiva y con ello genera menos alteraciones en la flora GI que otras tetraciclinas que sufren ciclo enterohepático como la oxitetraciclina.<sup>1</sup> Así la doxiciclina es excretada principalmente a través de las heces (50%) en forma de un metabolito inactivo que no sufre ciclo entero-hepático. En perros se biotransforma hasta en un 40% y se excreta principalmente por bilis y secreciones intestinales (<5% y 75%, respectivamente) en forma de un metabolito microbiológicamente inactivo. Dada su

excreción vía gastrointestinal se afirma que la doxiciclina se puede utilizar en pacientes con insuficiencia renal.<sup>71</sup>

#### 2.2.10 TOXICIDAD Y EFECTOS ADVERSOS.

La doxiciclina cuando se administra por vía oral, ocasionalmente puede causar vómito y náusea en el perro y gato en éste último es más común que ocurran dichos efectos.<sup>19</sup> Por vía IM es muy dolorosa y puede causar inflamación y lesión en los tejidos de aplicación.<sup>1,69</sup>

En estudios con perros se ha documentado efectos colaterales ocasionales a dosis terapéuticas como la fototoxicosis, hiperpigmentación de la glándula tiroides y hepatotoxicidad. No se ha reportado efectos teratogénicos.<sup>66,67</sup>

Agwuh y MacGowan<sup>70</sup> reportan que en la actualidad en la mayoría de los países se encuentra disponible una formulación para administración oral en medicina humana y veterinaria, ya sea como tableta o en premezcla para cerdos o en solución para el agua de bebida en aves. En medicina humana, se cuenta con un preparado para administración endovenosa (IV). Se han hecho algunos estudios para mejorar su relación farmacocinética/farmacodinamia (PK/PD) en medicina veterinaria. Por ejemplo, Haerdi-Landerer *et al*<sup>71</sup> desarrollaron doxiciclina encapsulada en microesferas para ser aplicadas por vía articular para el tratamiento de artritis sépticas en bovinos y equinos con resultados positivos. Zetner y Rothmueller,<sup>73</sup> informaron del tratamiento exitoso de la enfermedad periodontal en perros de raza Beagle mediante implantes de doxiciclina incluidos en polímeros.

Según Vargas *et al*.<sup>12,13</sup> el preparado de doxiciclina hiclato de larga acción (DOX-h-LA), no genera irritación tisular severa después de la aplicación parenteral en bovinos y cabras y

logra concentraciones terapéuticas durante más de 80 h. Genera una masa ocupativa en el sitio de aplicación subcutáneo sin ser una reacción inflamatoria aparente. Así, se libera el principio activo con una cinética aparentemente de orden cero. Los autores informan que después de la administración SC del preparado mencionado, la doxiciclina alcanza una  $C_{\max}$  de  $2.00 \pm 0.96 \mu\text{g/mL}$  con una  $T_{\max}$  de 25 h en becerros pre-rumiantes y una  $C_{\max}$  de  $2.4 \pm 0.95 \mu\text{g/mL}$  y un  $T_{\max}$  de  $19.23 \pm 2.03$  h en cabras. Las concentraciones tienden a mantenerse por al menos 48 h y decrecen lentamente después, pero siempre excediendo el límite menor fijado como concentración plasmática terapéuticamente útil de  $0.5 \mu\text{g/mL}$  hasta completar 80 horas en becerros y 84 horas en cabras con un tiempo medio de residencia (MRT) de 44.83 h. Las concentraciones logradas se consideran terapéuticas; por encima de las CMI la mayoría de los organismos sensibles. La biodisponibilidad para este preparado reportado por los autores fue de 545%, lo que refleja un efecto de absorción prolongada y una cinética de *flip-flop* <sup>\*2</sup> y como a menudo ocurre en los fármacos donde la liberación es de larga acción, la biodisponibilidad se eleva de manera extraordinaria.

### 2.3 DIFERENTES DOSIS DE DOXICICLINA EN PERROS.

**En infecciones susceptibles:** 5 mg/kg PO o IV 12h; administrar con alimento si disturbios gastrointestinales ocurren; evitar en animales jóvenes; evitar o reducir la dosis en animales con enfermedad hepática severa.<sup>75</sup> 5-10 mg/kg 12-24h PO o 5 mg/kg IV 24h.<sup>76</sup>

---

<sup>\*2</sup> Cinética *flip-flop* = se refiere a que el comportamiento farmacocinético es más dependiente de la tasa de absorción que de la de eliminación.

**En Ehrlichiosis:** 5 mg/kg PO, IV una vez al día durante 7 días en casos agudos, y 10 mg/kg PO una vez al día durante 7-21 días en casos crónicos.<sup>77</sup>

**En traqueobronquitis infecciosa (*Bordetella*):** 5-10 mg/kg PO dos veces al día.<sup>78</sup>

**En Leptospirosis:** 2.5-5 mg/kg PO dos veces al día, durante 2 semanas, posterior a 2 semanas de terapia con penicilina con el fin de eliminar la fase renal portadora.<sup>78</sup>

**En poli-artritis por Rickettsias:** 5 mg/kg PO dos veces al día<sup>78</sup>

**En fiebre manchada de las Montañas Rocallosas:** 5-10 mg/kg PO q12 horas durante 14 a 21 días.<sup>78</sup>

**En enfermedad de Lyme:** 10 mg/kg PO q24h durante 21-28 días.<sup>51</sup>

**En artritis bacteriana asociada a formas L:** 5 mg/kg PO dos veces al día, durante 14 días.<sup>78</sup>

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Dado que las tetraciclinas son antibióticos clasificados como tiempo dependiente, requieren más de una estancia prolongada a concentraciones plasmáticas terapéuticas, que concentraciones elevadas en poco tiempo. Por esta razón, es factible pensar, que si inclusión en un sistema de liberación prolongada, mediante su inclusión en matrices poliméricas, puede generar preparados farmacéuticos que brinden concentraciones terapéuticas sostenidas por más de 2 días y con ello un diseño de aplicación parenteral mejor, con respecto a los preparados hasta ahora disponibles a nivel mundial. Dada la dificultad técnica para generar nuevas opciones antibacterianas, con vida media de eliminación prolongada y que permitan un intervalo de dosificación de días, se ha recurrido

al diseño farmacológico de la doxiciclina porque es en términos generales 60 veces más potente que la tetraciclina, de los denominados de corta acción y también por su alta liposolubilidad. Se contaba con un preparado (doxiciclina hiclato de larga acción; DOX-h-LA) desarrollado por Vargas *et al.*<sup>84,101</sup> sin datos farmacológicos – farmacodinámicos para pequeñas especies por lo que se requirieron estudios para determinar el sitio idóneo de inyección y la definición de su farmacocinética para proponer una dosis e intervalo de dosificación congruente con su farmacodinamia.

Este trabajo, propone una alternativa microbiana parenteral para perros, y pretende impulsar la idea de que en México se pueden realizar diseños farmacéuticos, farmacológicamente congruentes y con tecnología de punta, éste preparado es único en el mundo y su incorporación ética a la práctica veterinaria de pequeñas especies podría marcar un nuevo rumbo en la manera en la que se desarrolla la industria farmacéutica veterinaria en México. La formulación del preparado experimental inyectable de liberación prolongada en perros clínicamente sanos, elaborado a base de hiclato de doxiciclina constituido en una matriz polimérica de poloxámero, habiendo incluido la doxiciclina en  $\beta$  ciclodextrina: doxiciclina hiclato de larga acción (DOX-h-LA) fue desarrollada por Vargas *et al.*<sup>101</sup> y actualmente no existían datos formales de la respuesta en perros por lo que se requirió estudios para la definición de su farmacocinética y poder proponer una dosis e intervalo de dosificación congruente con su farmacodinamia.

La doxiciclina, es un fármaco que presenta liposolubilidad alta, permitiéndole una amplia penetración tisular, confiriéndole cierta ventaja respecto a las otras tetraciclinas. Tiene un amplio efecto antibacteriano; posee efecto bacteriostático, es muy activa contra bacterias anaerobias, bacterias facultativas,<sup>102-105</sup> protozoarios y rickettsias.<sup>106</sup> Además debido a su alta unión a proteínas plasmáticas posee una prolongada vida media biológica. Sin

embargo, se han descrito desventajas para este tipo de medicamento, por un lado al ser bacteriostático, el tratamiento requiere períodos prolongados, para que se mantengan las concentraciones plasmáticas terapéuticas óptimas para inhibir a las bacterias<sup>7</sup> (CMI), otra desventaja de la doxiciclina es la irritación del tubo gastrointestinal, náuseas y vómito que presentan los pacientes. Existen formulaciones de doxiciclina que se administran tanto por vía oral como parenteral, la vía parenteral se recomienda para minimizar el impacto en la flora intestinal, pero existe la desventaja de que su administración por vía IM es muy dolorosa e irritante.<sup>20,107</sup>

Si se toma en cuenta que no se ha generado y es poco probable que se genere en corto plazo una nueva familia de antimicrobianos para medicina veterinaria, la tendencia natural es la de diseñar presentaciones que hagan óptimo el efecto de los antimicrobianos con los que se cuenta. Es factible suponer que si se pudo manipular a la doxiciclina inyectable para destacar su característica farmacológica, esto es que se le encuentre en el plasma por largos períodos hasta de 5 días, se lograría virtualmente un nuevo antimicrobiano, permitiendo con una sola administración mantener concentraciones antibacterianas adecuadas durante largo períodos más compatibles con el manejo moderno de pequeñas especies. Una atractiva opción terapéutica en el área veterinaria ya que reducen el manejo de los animales y proporcionan un adecuado control terapéutico de las infecciones bacterianas, ajustándose a las propiedades farmacocinéticas.

#### **4. JUSTIFICACIÓN.**

Para hacer óptimo el manejo de los antibacterianos dependientes del tiempo, se considera ideal, contar con formulaciones que logren las concentraciones séricas adecuadas, al nivel de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del patógeno o ligeramente arriba de éste por el mayor tiempo posible. Dada la dificultad técnica para generar nuevas opciones antibacterianas, con vida media de eliminación prolongada, que permitan un intervalo de dosificación de días, se acude al diseño farmacológico de moléculas ya existentes para generar nuevas formulaciones en perros y lograr una liberación controlada o sostenida mediante la manipulación de los vehículos. La doxiciclina es un ejemplo claro de lo anterior en el tratamiento de la erlichiosis canina que se prescribe generalmente por varios días, pero sus efectos colaterales como la irritación gástrica y el vómito limitan su eficacia clínica y no se puede aplicar en forma parenteral como solución simple porque induce necrosis tisular severa. Una formulación parenteral de liberación sostenida de doxiciclina que tenga limitada su capacidad irritante tiene ventajas como la disminución del estrés por manejo, terapias antibacterianas adecuadas en tiempo y concentración y obviamente mejora de la actividad terapéutico-clínica. Este trabajo, propone una alternativa microbiana parenteral para perros, de diseño farmacéutico-farmacológico, en términos de su farmacodinamia-farmacocinética con la factibilidad de adaptar la DOX-h-LA para su aplicación en perros y estudiar su cinética plasmática a fin de proponer sus posibles intervalos de dosificación considerando un 100% de tiempo de concentración sérica en o por arriba de la CMI de los patógenos para los cuales está indicado este antibacteriano. Se contó con un preparado experimental derivado de estudios previos, mismos que se adaptaran con pequeñas modificaciones. Vale la pena destacar que a la fecha no existe en el mundo otra DOX-h-LA, éste preparado es único y su incorporación ética a la práctica

veterinaria de pequeñas especies podría marcar un nuevo rumbo en la manera en la que se desarrolla la quimioterapia de enfermedades sensibles a la Doxiciclina.

DOX-h-LA en el sitio de inyección genera una protuberancia (no inflamatoria, solo una masa ocupativa) que desaparece hasta los 30 días generando una liberación sostenida y de larga acción. Esto, le confiere ventajas clínicas sobre otras tetraciclinas, como la disminución del estrés por manejo en tratamientos largos, terapias antibacterianas prolongadas con buena concentración, lo que obviamente mejora la actividad terapéutico-clínica. A su vez, en perros esto puede dar como consecuencia la disminución de problemas asociados a la falta de seguimiento estrecho de las indicaciones del médico, que a menudo no se sigue por que se presentan los efectos colaterales como el vómito, gastritis irritativa y la falta de compromiso de los dueños.

## **5. HIPÓTESIS.**

Se postula que la Doxiciclina Hiclato de Larga Acción aplicada por vía subcutánea en perros clínicamente sanos repita el fenómeno de larga acción con una duración terapéutica útil hasta por 96 horas, que mostro en estudios previos con otras especies.

## **6. OBJETIVO GENERAL.**

Determinar los valores farmacocinéticos de doxiciclina de larga acción (DOX-h-LA) por vía subcutánea en perros clínicamente sanos y su modelaje PK/PD para establecer intervalos de dosificación basados en la correlación de la farmacocinética lograda y los valores de concentración mínima inhibitoria de los principales patógenos sensibles al fármaco.

### **6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1. Determinar el sitio idóneo de administración del preparado experimental ( DOX- h- LA) al 10% en el perro por vía SC.
2. Determinar el volumen máximo a inyectar del preparado experimental en perros clínicamente sanos por sitio de aplicación.
3. Determinar la concentración plasmática vs. Tiempo de la doxiciclina mediante una modificación de un método microbiológico, posterior a la administración SC de DOX-h-LA 10 % en perros clínicamente sanos.
4. Determinar los valores farmacocinéticos después de su aplicación por vía SC del preparado experimental inyectable ,por vía VO de doxiciclina en capsula y por vía

IV de una solución acuosa de hielato de doxiciclina a una dosis de 10 mg/kg en perros clínicamente sanos

5. Llevar a cabo una correlación de los intervalos de dosificación con respecto a las CMI de los principales patógenos sensibles al fármaco y que afecta al perro.
6. Proponer una dosis e intervalo de dosificación congruente con su farmacodinamia en función de los valores CMI registrados del preparado experimental inyectable .

## **7. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **7.1 LUGAR DONDE SE LLEVO A CABO EL PROYECTO DE INVESTIGACION**

El presente estudio fue aprobado por el Comité de Investigación de Posgrado, Cuidado y Uso de Animales Experimentales, de acuerdo a la Regulación Oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999. La fase experimental se realizó en el laboratorio del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) de la FMVZ de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM) y las perreras de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de México ( UNAM ) , la fase analítica se realizó en el laboratorio del departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

## 7.2 GRUPO DE EXPERIMENTAL

Se hizo una selección de 30 canideos sin distinción de raza, sanos, adultos entre 4 y 10 años, con pesos de 7-35 kg. Se formaron 5 grupos de 6 animales cada uno, cada grupo se separo en dos bloques cada bloque constituido por 3 machos 3 hembras.

Grupo 1: Aplicación Subcutánea de DOX-h-LA en la región 1 ( por determinar)

Grupo 2: Aplicación Subcutánea de DOX-h-LA en la región 2 ( por determinar)

Grupo 3: Hiclato de Doxiciclina  
Doxiciclina PO

Grupo 4: Doxiciclina Solución  
Acuosa VO

Grupo 5: Doxiciclina Hiclato  
de Larga Acción SC (sitio  
Idóneo)

### 7.2.1 EXAMEN CLÍNICO.

Se hará un examen clínico a los animales antes de iniciar la prueba para determinar su estado de salud. Se anotarán parámetros clínicos como condición corporal, peso corporal <sup>3\*</sup> y constantes fisiológicas (temperatura, frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria. (véase Anexo 1).

### 7.2.2 MANEJO.

Todos los perros recibieron medicina preventiva (desparasitaciones y vacuna séxtuple del laboratorio Merial), se mantuvieron en observación para determinar que no presentaran enfermedad o alguna fase de incubación, 30 días previos a la administración por las diferentes vías y presentaciones de Doxiciclina no se les administró antibiótico alguno.

### 7.2.3 HEMOGRAMA Y QUÍMICA SANGUÍNEA.

Para determinación de hemograma se tomaron muestras de sangre por la vena yugular con un volumen de 5 ml en un tubo Vacutainer con EDTA con adaptador y para la química sanguínea 5 ml de sangre en un tubo Vacutainer sin anticoagulante con adaptador con énfasis en la determinación de los perfiles hepático, renal y muscular. Los valores incluidos en el hemograma son: Hematocrito, hemoglobina, conteo total de eritrocitos, volumen globular medio (VGM), concentración globular media de hemoglobina (CGMH), proteínas plasmáticas totales, fibrinógeno, cuenta leucocitaria total y cuenta leucocitaria diferencial. La química sanguínea incluyo glucosa, colesterol, proteínas totales, albúmina, globulinas

---

<sup>3</sup>Se determinará mediante el uso de la cinta Purina Hills para medir el perímetro torácico

urea, creatinina, fosfatasa alcalina sérica (SAP), aspartato amino transferasa sérica (AST), creatinofosfoquinasa (CPK), bilirrubina total, directa e indirecta y electrolitos (potasio, sodio, cloro, bicarbonato, calcio y fósforo).

Las muestras se procesaron en el Departamento de Patología Clínica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM (véanse Anexos 2 y 3).

#### 7.2.4 ALOJAMIENTO Y ALIMENTACIÓN.

Los animales se alojaron en las perreras del CIESA , durante su estancia recibieron dieta comercial y agua *ad libitum*.

### **7.3 DETERMINACION DEL SITIO IDONEO DE ADMINISTRACION DEL PREPARADO EXPERIMENTAL INYECTABLE.**

#### FASE I: CONOCER LOS SITIOS MÁS COMÚNMENTE UTILIZADOS PARA LA APLICACIÓN DE SUEROS Y MEDICAMENTOS EN PERROS.

Se llevo a cabo una revisión bibliográfica de diferentes fuentes de información, destacándose las del acervo de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia para conocer los sitios más comúnmente utilizados para la aplicación de medicamentos y sueros por vía subcutánea.

#### FASE II. ELECCIÓN DEL SITIO IDÓNEO PARA LA APLICACIÓN DE DOX-H-LA POR VÍA SUBCUTÁNEA.

De acuerdo a la literatura existente para la aplicación de medicamentos por vía subcutánea son las zonas con abundante tejido subcutáneo y piel laxa como las parte superior del cuello

en su unión con el tronco o también en la región costal.<sup>4</sup> Con base a lo anterior se eligen estos dos sitios antes mencionados para la aplicación de DOX-h-LA.( Vea figura 3)



**Figura 3.** Zonas para la aplicación de inyecciones o sueros por vía subcutánea.<sup>5</sup>

Se utilizaron doce perros mestizos clínicamente sanos; 6 machos y 6 hembras. Los perros se mantuvieron en el área de las perreras de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M. con agua y alimento *ad libitum*. Se dividieron 12 horas antes en dos grupos ( Grupo A y Grupo B), cada grupo estuvo constituido por 3 machos y 3 hembras.

<sup>4</sup> <http://galgoshile.foroactivo.com/t1667-forma-de-inyectar-subcutanea-medicamentos-o-suero>

<sup>5</sup> <http://www.veterinaria-online.com.ar/2009/11/tecnicas-de-aplicacion-de-inyecciones-en-perros-y-gatos/>

Después de medidas de antisepsia (rasurado y limpieza con una solución de yodo-povidona al 2%), se les administro a todos los perros por vía subcutánea Doxiciclina hiclato de larga Acción a dosis de 10 mg/kg Para el grupo A se le administró en el área de las cotillas y el grupo B en la región interescapular.

Adicionalmente y con la finalidad de observar alguna reacción dolorosa, algún tipo de irritación o lesión cutánea que llegara a causar la masa ocupativa y poder determinar el tiempo de desaparición de esta última y elegir sitio idóneo de aplicación del preparado experimental inyectable, se llevó a cabo la evaluación del comportamiento al momento de la aplicación para determinar si sufre dolor de manera subjetiva por tres observadores independientes y de manera ciega a la dosis. Se realizó por medio del cuadro del dolor de Melbourne.(Véase Anexo C)

### FASE III: DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE DESAPARICION DE LA MASA OCUPATIVA DE DOX-h-LA

Se evaluó la reacción tisular mediante el reconocimiento visual y a la palpación, en diferentes intervalos de tiempo 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 horas, a los 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 60 días después de la aplicación. Se tomaron medidas mediante un Vernier (suma del diámetro mayor y diámetro menor, y profundidad), se tomaron fotografías y se anotaron los hallazgos.

#### FASE IV: DETERMINACION DEL VOLUMEN MAXIMO DE ADMINISTRACION DEL PREPARADO EXPERIMENTAL INYECTABLE DOX-h-LA.

Se inició con un volumen de 1 ml , 0.5 ml y 0.3 ml por vía subcutánea del preparado de DOX-h-La en dos o tres sitios diferentes de acuerdo al tamaño del animal repartiendo la dosis total con la finalidad de determinar el volumen máximo tolerable del preparado por sitio de aplicación, Los animales se observaron cada 12 horas para detectar algún signo que mostrara alguna reacción adversa o toxicosis, tales como anafilaxia, lagrimeo, salivación, diarrea, hepatotoxicosis, nefrotoxicosis, hemoglobinuria, reacción inflamatoria en el sitio de administración o fotosensibilización.<sup>82</sup>

#### **7.4 DETERMINACION DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA VS. TIEMPO DE LA DOXICICLINA MEDIANTE UNA MODIFICACIÓN DE UN MÉTODO MICROBIOLÓGICO, POSTERIOR A LA ADMINISTRACIÓN DE DOX-H LA POR VÍA SC, SOLUCION ACUOSA DE DOXICICLINA POR VÍA IV Y POR VÍA PO DESPUES DE LA ADMINISTRACION ORAL DE TABLETAS DE HICLATO DE DOXICICLINA EN PERROS CLÍNICAMENTE SANOS.**

La concentración sérica de doxiciclina (estudio cuantitativo) se determinó por medio de un método microbiológico modificado de difusión en agar, descrito por Bennet *et al.*<sup>108</sup> en el que se mide la concentración en términos de la actividad antibacteriana *in vitro* del fármaco utilizando *Bacillus cereus* ATCC 11778. La solución estándar se preparó usando plasma de canino y se realizó una serie de diluciones del fármaco control. La concentración de doxiciclina se calculó por interpolación, comparando el diámetro de la zona de inhibición

con una curva construida con el estándar. En el método microbiológico se mide la concentración del fármaco comparando el diámetro de las zonas de inhibición de las muestras con las producidas por la solución estándar a varias diluciones. El límite de detección en ensayos previos es de 0.07 µg/ml y el límite de cuantificación de 0.1 µg/mL, valores que garantizan la obtención de datos útiles para realizar estudios de farmacocinética. Cabe señalar que según Pijpers *et al.*<sup>104</sup> existe una buena correlación entre la determinación de concentración de doxiciclina medida mediante cromatografía de líquidos de alta definición y el método microbiológico indirecto.<sup>105,106</sup> El mismo procedimiento fue utilizado para los grupos control , DOX-h-LA, DOX-IV y DOX-PO.

**Método de Bennet et al.** Se utilizó el agar Mueller Hinton (Bioxon)<sup>6\*</sup> el cual se preparó de acuerdo a las indicaciones del producto. Se utilizó una cepa bacteriana ATCC (*American Type Culture Collection*) 11778 de *Bacillus cereus*.

**Estandar Bacteriano.** En un tubo de tapón de rosca se colocaron 5 mL de agua destilada y una asada del cultivo bacteriano joven (resembrado 24 horas antes) de *Bacillus cereus*. Por medio de los estándares de Mc Farland<sup>91</sup> se realizaron los ajustes necesarios a la dilución para obtener una concentración al 0.5 de Mc Farland. La turbidez al 0.05 de Farland se obtuvo por medio de un espectofotómetro a una transmitancia del 60-65%, la cual corresponde a una concentración bacteriana de  $1 \times 10^{14}$ .

---

<sup>6</sup> Becton Dickinson de México , SA de CV.

**Preparación de las placas.** Se colocaron 300 mL de agar en un refractario tipo Pirex® de 21 x 20 cm, estéril y se dejó enfriar durante 10 min. Por medio de un hisopo estéril se sembró homogéneamente sobre todo el agar (400 µL de la suspensión bacteriana).<sup>105</sup>

**Preparación de diluciones seriadas al 50 %.** Se pesaron 20 g de estándar de doxiciclina (98% de pureza), se colocó en una matraz y se aforó a 100 mL con agua desionizada. Se marcaron tubos de 5 mL del 1 al 10 y uno de 15 mililitros con el número 0, en el matraz numerado con el 0 se colocaron 9 mL de agua desionizada y en los demás tubos se colocó 1 mL en cada uno de ellos. Del matraz se tomó 1 mL y se agregó en el tubo 0 y se homogenizó, de este se tomó 1 mL y se agregó al tubo 1, se homogenizó en seguida se tomó 1 mL y se agregó al tubo 2 y así se continua hasta completar los 10 tubos, teniendo finalmente las siguientes diluciones que se muestran en el cuadro 3.<sup>108</sup>

---

**Cuadro 3**

---

**CONCENTRACIONES DE DOXICILINA**

---

<b>No MATRAZ 200 mL</b>	<b>CONCENTRACION HICLATO DE DOXICILINA (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
0	20
1	10
2	5
3	2.5
4	1.25
5	0.625
6	0.3125
7	0.15625
8	0.078125
9	0.0390625
10	0.01953125

---

**Lectura de la Placa.** Una vez preparada la placa y con ayuda de un

sacabocados se realizaron a lo largo del refractario dos hileras de 10 pozos cada una. Se colocó en cada pozo 100  $\mu$ L de cada una de las diluciones, se realizó por duplicado. Se realizaron 5 placas en el mismo día con la misma metodología con la finalidad de tener un total de 10 lecturas, se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Transcurridas las 24 horas se realizaron las lecturas de milímetros de halo de inhibición por pozo y por placa.<sup>105</sup>

**Procesamiento de las lecturas de los halos de inhibición.** Se obtuvieron medias y desviaciones estándar del diámetro de halo de inhibición de cada una de las diluciones . A partir de los cuales y con ayuda de los programas Microcal origin y Excel , se obtuvieron las gráficas de milímetros de halo de inhibición & concentración.

**Procesamiento de los sueros.** Se prepararon las placas con la misma concentración bacteriana y del mismo modo en que se prepararon las placas para obtener el estándar mediante las pruebas de Bennet, se realizaron los pozos en la misma forma que los anteriores y en la misma placa se sembraron los mismos tiempos de muestreo de los 10 grupos, colocándose 100  $\mu$ L de suero, se incubaron durante 24 horas y se realizaron las lecturas de los milímetros de halos de inhibición, esto se repitió para cada uno de los tiempos de muestreo de cada uno de los grupos.<sup>105</sup>

## **7.5 OBTENCION DE MUESTRAS SANGUÍNEAS PARA SU PROCESAMIENTO DESPUES DE SU APLICACION POR LAS DIFERENTES VIAS ( SC,PO,IV) DE DOX-h-LA, DOX-H Y DOXICICLINA EN SOLUCION ACUOSA.**

Para Vía subcutánea: Preparado experimental inyectable DOX-h-LA

Vía Intravenosa: Solución Acuosa de Doxiciclina Vía Oral: tabletas de Hiclato de doxiciclina

Todas las presentaciones farmacológicas fueron aportadas por el laboratorio PARFARM S.A

Cada perro se pesó y se ajustó cada presentación para las diferentes vías de administración de la doxiciclina, se les colocó un cateter heparinizado de 3 pulgadas de longitud (Becton Dickinson, México City ) en la vena yugular para la obtención de muestras sanguíneas. Se recolectaron 5 mL de sangre , en los siguientes intervalos de tiempo: 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 10, 24, 48 ,72 y 96 horas post administración. Las muestras fueron colocadas a 45 grados y se dejaron temperatura ambiente durante 30 minutos ,posteriormente centrifugadas durante 15 minutos 3500 rpm. El plasma fue extraído y depositado en viales, identificados y congelados a -20° C hasta que fueron procesadas 8 días después

## **7.6 DETERMINACION DE LOS VALORES FARMACOCINÉTICOS DE LA DOXICICLINA MEDIANTE POSTERIOR A LA ADMINISTRACIÓN SC, IV Y VO DE DOX-H-LA 10 % EN PERROS CLÍNICAMENTE SANOS.**

### **7.6.1 ANÁLISIS Y PROCESAMIENTO DE LOS RESULTADOS.**

De los resultados obtenidos por tiempo de sangrado y por grupo se extrapolaron en la gráfica de concentraciones & halo de inhibición obteniéndose así los µg/mL de cada una de

las muestras de suero. Los análisis farmacocinéticos se procesaron por medio de los programas Microcal Origin versión 8.0 Software, en el cual se calculó la regresión lineal y Micromath PkAnalysis Scientific Software en el que se obtuvo el modelo farmacocinético, las variables farmacocinéticas que se compararon estadísticamente son aquellos que reflejaron directamente la potencia clínica y la significancia clínica de la formulación prolongada ( $\beta$ -ciclodextrina-polímeros) se estimó el área bajo la curva (AUCs), vida media terminal por regresión lineal, volumen aparente de distribución, pico de concentración sérica del fármaco, valor de vida media de eliminación, biodisponibilidad a partir del AUC, y concentración sanguínea definida de mantenimiento, así como el análisis estadístico para cada uno de los productos que se utilizaron. Posteriormente los datos obtenidos por tiempo de sangrado por grupo se evaluó la diferencia entre medias y análisis de varianza, con los cuales se realizaron las gráficas de concentración vs tiempo, a partir de las cuales se obtuvieron las farmacocinéticas de cada uno de los grupos. ( Grupo3 IV,4PO y 5SC )

Los valores farmacocinéticos a determinar fueron:

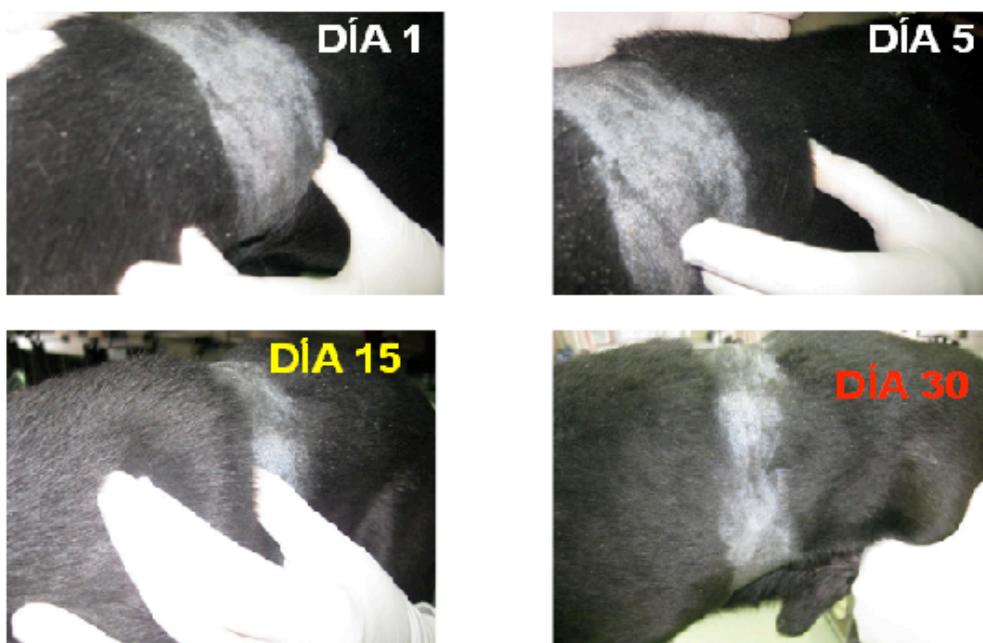
- Área bajo la curva (AUC),
- Área bajo la curva al infinito ( $AUC_1$ ),
- Tiempo medio de permanencia (MRT),
- Constantes de la fase de distribución (a) y eliminación (b),
- Vida media de eliminación ( $T_{1/2b}$ ),
- Vida media de absorción ( $T_{1/2ab}$ ),
- Constante de eliminación ( $K_{elim}$ ),
- Constante de absorción ( $K_{ab}$ ),
- Concentración máxima ( $C_{max}$ ),

- Tiempo máximo ( $T_{\max}$ ), c
- Concentración sérica máxima al tiempo 0 ( $C_{s0}$ ).

## 8. RESULTADOS.

### 8.1 DETERMINACION DEL SITIO IDONEO DE ADMINISTRACION DEL PREPARADO EXPERIMENTAL INYECTABLE.

En la figura 4 se observa la formación de una masa ocupativa de Doxiciclina Hiclato de Larga Acción y se llega a la conclusión, avalada por 167 perros que la aplicación subcutánea del preparado experimental (Doxiciclina-Hiclato de Larga Acción) en el área de las costillas no induce fistulaciones , abscesos o alguna otra reacción y que la masa ocupativa desaparece a los 30-36 días.



**Figura 4.** Imágenes donde se muestra la reacción local en días, una vez que se aplico el preparado experimental de Doxiciclina hiclato de larga acción.

## **8.2 DETERMINACION DEL VOLUMEN MAXIMO DE ADMINISTRACION DEL PREPARADO EXPERIMENTAL INYECTABLE.**

Estudios previos en otras especies indican la posibilidad de obtener concentraciones terapéuticas por al menos 4 días y por ello se postuló como hipótesis del trabajo que el fenómeno de larga acción observado podría repetirse en perros, pero requería confirmación y definición. Adicionalmente fue necesario establecer el volumen a inyectar, para evitar la presentación de reacciones locales del preparado. Se llega a la conclusión, avalada por 167 perros que la aplicación subcutánea del preparado experimental (Doxiciclina-Hiclato de Larga Acción) de 0.3-0.5 mL como volumen máximo por sitio de aplicación en el área de las costillas no induce reacciones locales indeseables. Se tiene la percepción al final del estudio que la respuesta en términos del dolor y con los volúmenes referidos puede considerarse no mayor al dolor que inducen otros fármacos

## **8.3 DETERMINACION DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA VS. TIEMPO DE LA DOXICICLINA MEDIANTE UNA MODIFICACIÓN DE UN MÉTODO MICROBIOLÓGICO, POSTERIOR A LA ADMINISTRACIÓN SC, IV Y VO DE DOX-H-LA 10 % EN PERROS CLÍNICAMENTE SANOS.**

Las concentraciones de doxiciclina se determinarán mediante el análisis de difusión en agar modificado, descrito por Abd al Aty et al.<sup>104</sup> con *Bacillus cereus* ( ATCC-11778) como organismo de prueba que crece en agar Mueller Hinton (MCD LAB, SA de CV, México DF) Las concentraciones fármaco fueron calculadas por interpolación, comparando el diámetro de la zona de inhibición con una curva construida con el estándar, usando un análisis de regresión lineal. El Coeficiente de variación intraensayo fue de < 4.9, y el

interensayo de < 4.8. El ensayo analítico tiene una linealidad sobre un rango de concentración de 0.05 a 10 µg/mL y un porcentaje de recuperación de  $94 \pm 2$  y un coeficiente de correlación (r2) de  $0.97 \pm 0.1$ , el límite de detección fue de 0.005 µg/mL y el límite de cuantificación fué de 0.01 µg/mL Los análisis farmacocinéticos fueron procesados por medio del programa PKAnalyst®, Micromath Scientific Software, SLM, USA 2001 después de la administración de DOX-h-LA y doxiciclina acuosa DOX-h por las vías SC, IV y PO, este modelo se utiliza para ajustar y analizar los perfiles de concentración en función del tiempo de cada perro y la media de los valores derivados. La curva obtenida de concentración vs tiempo de doxiciclina hiclato después de la administración de las vías PO y SC fueron obtenidas mediante un modelo de dos compartimientos (Modelo 13,  $r \geq 0.98$ ), cuya fórmula es:

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

La curva tiempo -concentración de DOX-h IV se ajustó mejor utilizando un modelo de un compartimiento (Modelo 7  $r \geq 0.99$ ) Con las siguiente fórmula:

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

La variables farmacocinéticas de doxiciclina de los tres tratamientos se presentan en el cuadro 3 estas fueron obtenidas con PK Analyst y fueron las siguientes:

AUC<sub>0-∞</sub> = área bajo la curva; AUMC<sub>0-∞</sub> área bajo la curva de momentos; MRT = tiempo medio de residencia, A, B = constantes de velocidad híbrido, alfa y beta = constantes de velocidad de híbridos para la distribución y fases de eliminación, respectivamente;  $T_{1/2\beta}$  =

vida media de la eliminación,  $t_{1/2\beta}$  = vida media de la absorción;  $K_{elim}$  = constante de eliminación del fármaco,  $C_{máx}$  = concentración máxima,  $T_{máx}$  = tiempo de pico;  $CS_0$  = máxima concentración sérica en el momento cero. Otras variables, tales como  $V_dAUC$  = volumen aparente de distribución basada en el AUC;  $V_{dss}$  = volumen aparente de distribución en estado estacionario;  $V_{dc}$  = volumen aparente del compartimento central y  $Cl$  = aclaramiento corporal, se obtuvieron con las fórmulas estándar, según lo propuesto por Welling.<sup>104</sup>

Biodisponibilidad (F%) : Los valores fueron calculados usando las siguientes fórmulas:

$$F\% = \frac{AUC\ e.v.}{AUC\ i.v.} \times \frac{Dosis\ i.v.}{Dosis\ e.v.} \times 100$$

$$F\% = \frac{AUC\ e.v.}{AUC\ i.v.} \times \frac{t_{1/2\beta}\ i.v.}{t_{1/2\beta}\ e.v.} \times 100$$

Los datos se presentan como media  $\pm$  desviación estándar de 12 observaciones para cada parámetro y para las comparaciones estadísticas de  $C_{max}$ ,  $T_{max}$ , AUC, MRT y  $T_{1/2\beta}$  entre los grupos de la prueba de ANOVA y Bonferroni, se utilizaron.

La comparación de las variables AUC, TR y  $T_{1/2\beta}$  resultaron ser estadísticamente diferentes para los 3 grupos ( $P < 0.05 < 0.001$ ). La F% para DOX-h-LA fue de 141.21 %, mientras que para la DOX-h-PO fue de 76.97 %. los valores obtenidos para  $T_{1/2\beta}$  fueron  $119,91 \pm 1,27$  h para DOX-h-LA  $3,70 \pm 0,09$ h para el DOX-h-PO, y  $0,19 \pm 0,05$  h

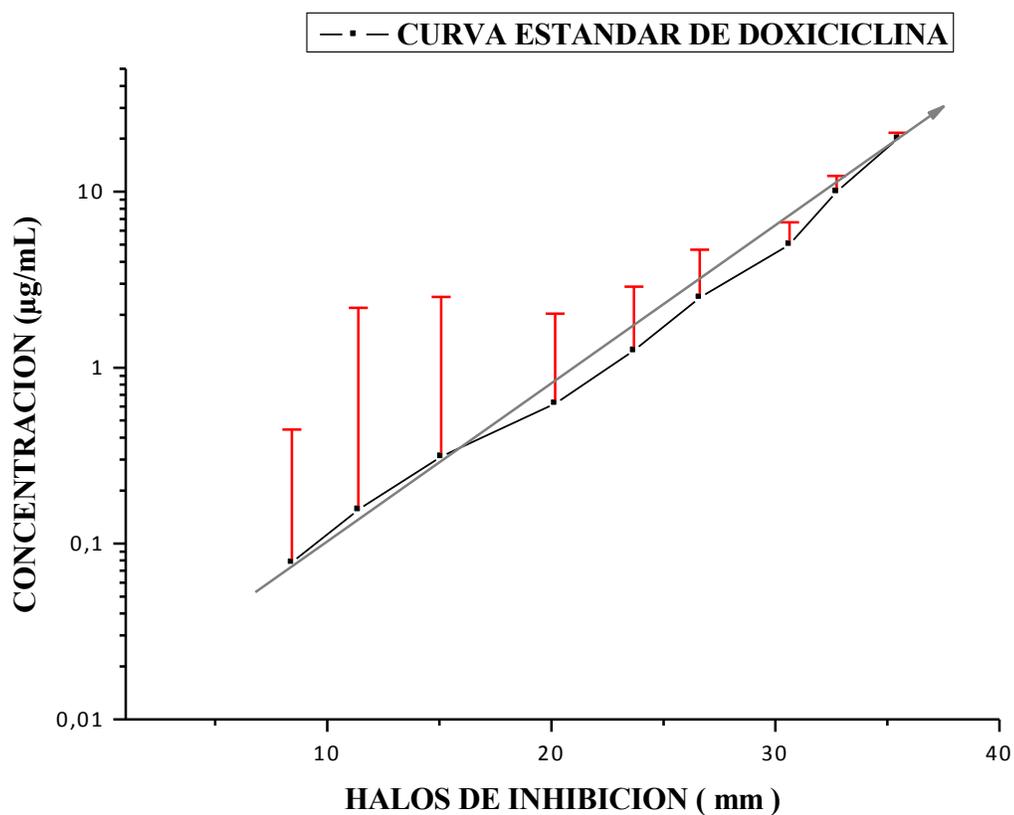
para DOX-H-IV. la diferencia entre estos medios estadísticos mostraron que la vida media obtenida para DOX-h-LA fue estadísticamente mayor (  $P < 0.001$  ).

Basado en una arbitraria concentración terapéutica mínima una evaluación comparativa se hizo de la longitud de tiempo durante el cual se mantuvo una concentración dada de suero de doxyxycina. Valor elegido fue de 0,12 mg / ml .Con esta opción, DOX-h IV mantiene adecuadas las concentraciones séricas de 8 h; DOX-h-PO durante 22 horas y de DOX-h-LA extendió estos periodos de tiempo de aproximadamente 200 horas. El momento en que las concentraciones séricas de Doxiciclina se encontraban en un nivel adecuado fue estadísticamente diferente al comparar DOX-h-LA, ya sea con DOX-h-IV y DOX-h-PO ( $P < 0,001$ ).

No se obtuvieron muestras de tejido de los sitios de inyección, sin embargo se observó que no hay una respuesta inflamatoria en el sitio de inyección con el preparado experimental inyectable DOX-h-LA. Sin embargo se observó un abultamiento bien definido indoloro, el cual permaneció y fue detectable por poco más de 30 días. Estas protuberancias se cree que no son respuestas inflamatorias, son grumos ocupados en el lugar del espacio causados por el poloxámero al convertirse en gel a la temperatura corporal. Después de 30 días estas protuberancias desaparecen. Los animales no mostraron ningún signo inusual de dolor o malestar en la preparación de acción prolongada o bien cuando se inyecta o después.

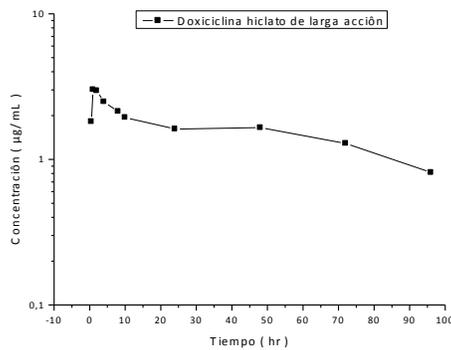
## 8.4 GRAFICAS CON LOS RESULTADOS FARMACOCINÉTICOS

8.4 .1 VALORES FARMACOCINÉTICOS DE LA PRUEBA SE MUESTRAN EN LA FIGURA 5 CON LA CURVA ESTÁNDAR DE LA DOXICICLINA Y SU LÍMITE DE DETECCIÓN.

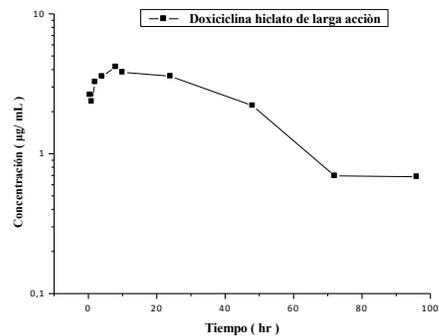


**Figura 5.** Curva Estándar de la Doxiciclina y su límite de detección

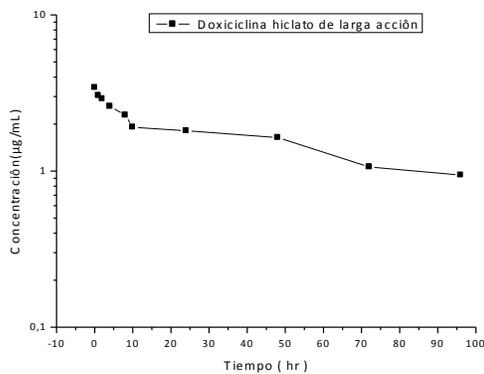
8.4.2 RESULTADOS FARMACOCINÉTICOS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN SC DEL PREPARADO EXPERIMENTAL DOXICICLINA HICLATO DE LARGA ACCIÓN (DOX-h-LA EN HEMBRAS CLINICAMENTE SANAS).



**Figura 5.** Farmacocinética en perro (hembra 1) después de la administración subcutánea, a una dosis de 10 mg/kg de DOX-h-LA

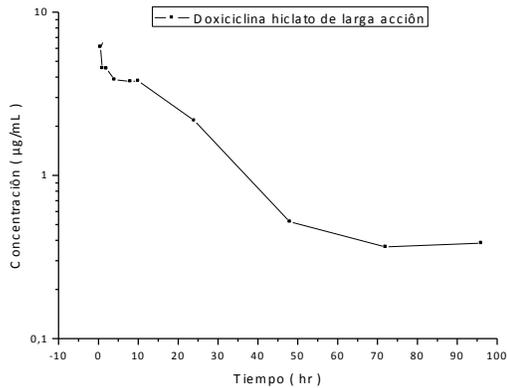


**Figura 6.** Farmacocinética en perro (hembra 2) después de la administración subcutánea, a una dosis de 10 mg/kg de DOX-h-LA

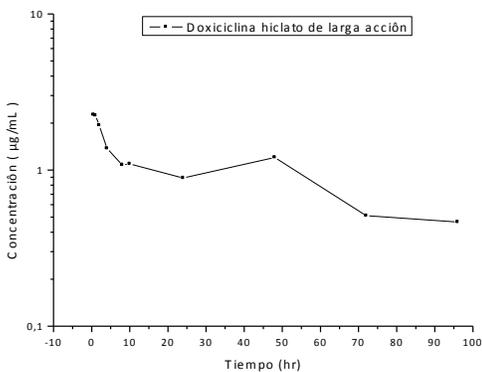


**Figura 7.** Farmacocinética en perro (hembra 3) después de la administración subcutánea, a una dosis de 10 mg/kg de DOX-h-LA

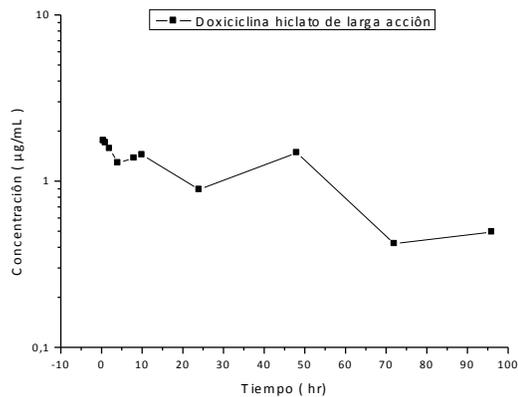
8.4.3 RESULTADOS FARMACOCINÉTICOS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN SC DEL PREPARADO EXPERIMENTAL DOXICICLINA HICLATO DE LARGA ACCIÓN (DOX-h-LA EN PERROS CLINICAMENTE SANOS).



**Figura 8.** Farmacocinética en perro (macho 2) después de la administración subcutánea, a una dosis de 10 mg/kg de DOX-h-LA

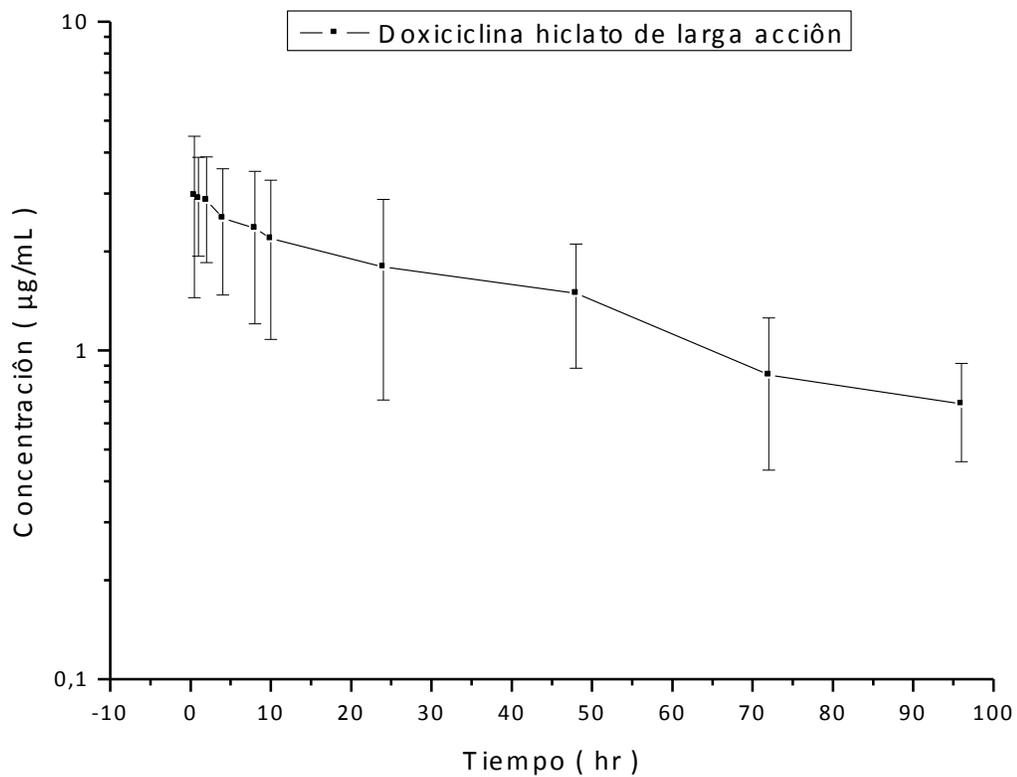


**Figura 9.** Farmacocinética en perro (macho 1) después de la administración subcutánea, a una dosis de 10 mg/kg de DOX-h-LA



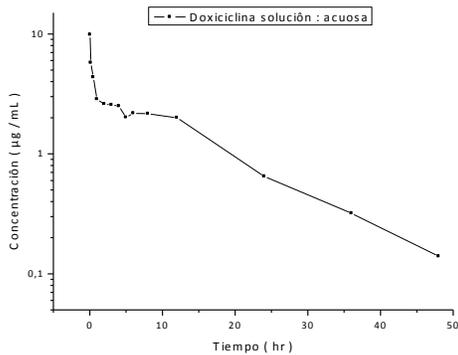
**Figura 10.** Farmacocinética en perro (macho 3) después de la administración subcutánea, a una dosis de 10 mg/kg de DOX-h-LA

#### 8.4.4 GRÁFICA PROMEDIO DE DOX-H-LA POR VÍA SUBCUTÁNEA

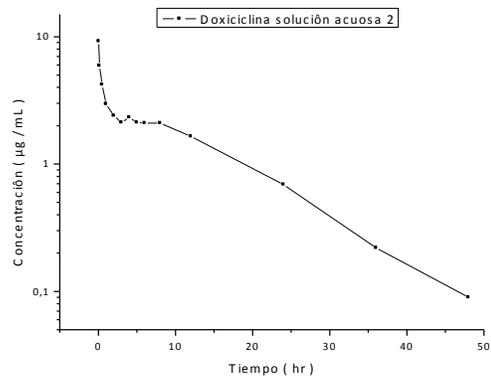


**Figura 11.** Farmacocinética en perros (macho y hembras) después de la administración subcutánea, a una dosis de 10 mg/kg de DOX-h-LA.

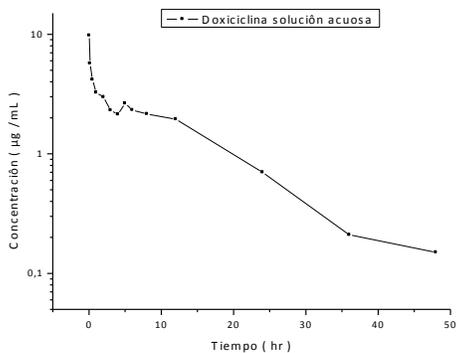
#### 8.4.5 RESULTADOS FARMACOCINÉTICOS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN IV DE UNA SOLUCION ACUOSA DE HICLATO DE DOXICICLINA EN PERRAS CLINICAMENTE SANAS.



**Figura 12.** Farmacocinética en perro (hembras 1) después de la administración Intravenosa, a una dosis de 10 mg/kg de doxiciclina en solución acuosa.

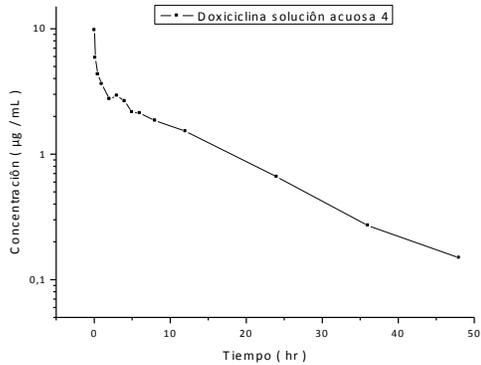


**Figura 13.** Farmacocinética en perro (hembras 2) después de la administración Intravenosa, a una dosis de 10 mg/kg de doxiciclina en solución acuosa.

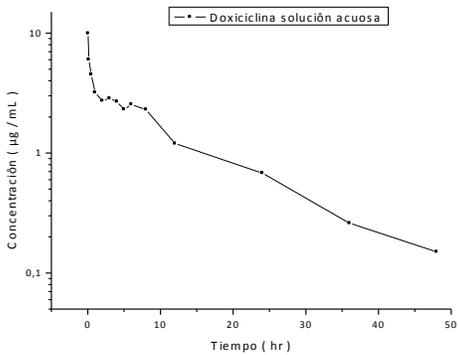


**Figura 14.** Farmacocinética en perro (hembra 3) después de la administración Intravenosa, a una dosis de 10 mg/kg de doxiciclina en solución acuosa.

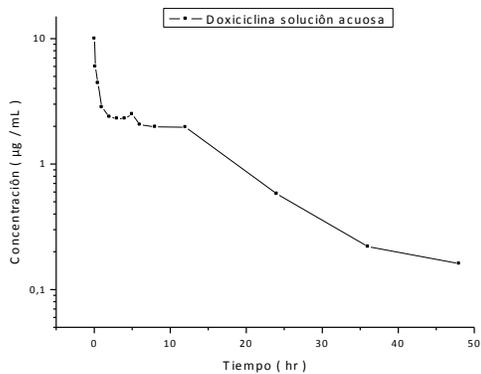
#### 8.4.6 RESULTADOS FARMACOCINÉTICOS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN IV DE UNA SOLUCIÓN ACUOSA DE HICLATO DE DOXICICLINA EN PERROS CLINICAMENTE SANOS.



**Figura 15.** Farmacocinética en perro (macho 1) después de la administración Intravenosa, a una dosis de 10 mg/kg de doxiciclina en solución acuosa.

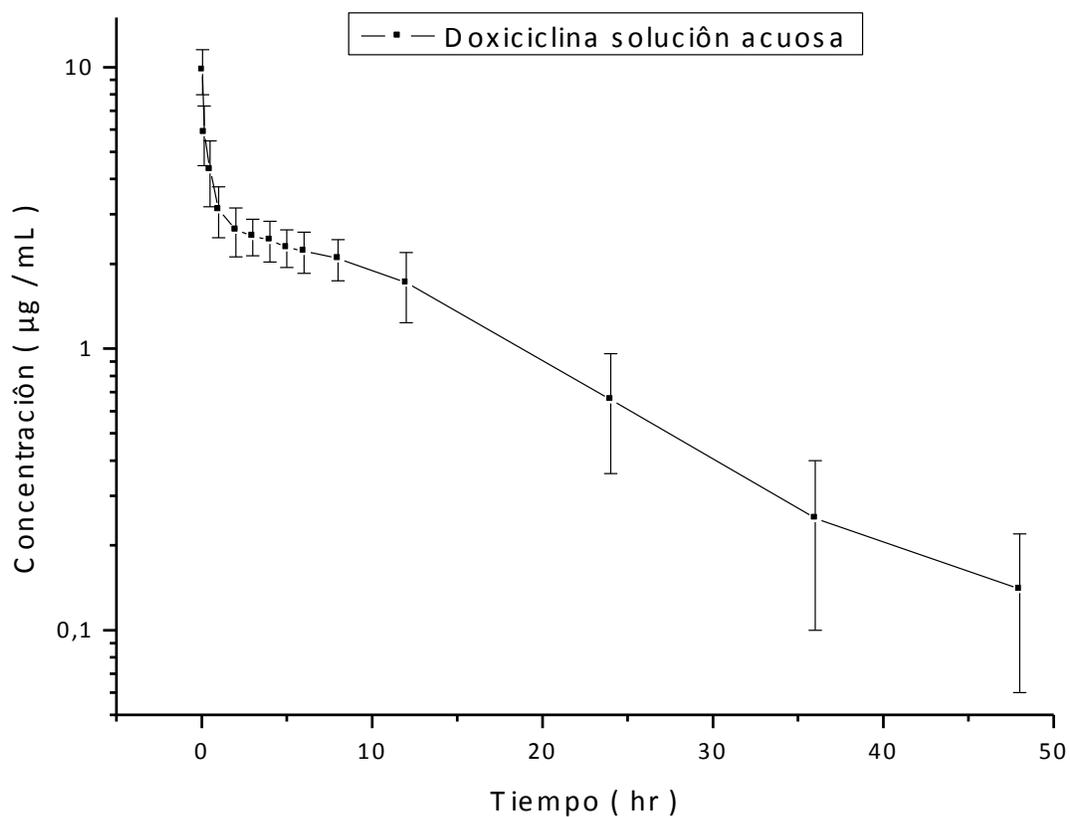


**Figura 16.** Farmacocinética en perro (macho 2) después de la administración Intravenosa, a una dosis de 10 mg/kg de doxiciclina en solución acuosa.



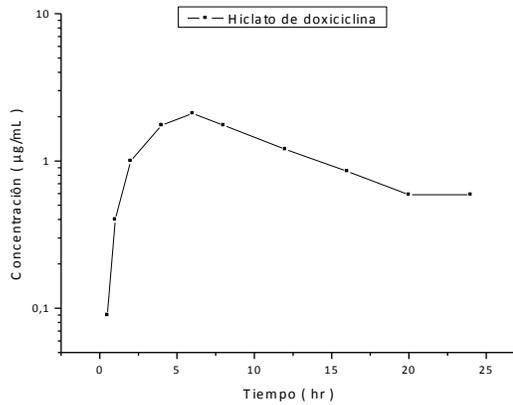
**Figura 17.** Farmacocinética en perro (macho 3) después de la administración Intravenosa, a una dosis de 10 mg/kg de doxiciclina en solución acuosa.

8.4.7 GRAFICA CON LOS PROMEDIOS FARMACOCINÉTICOS, EN PERROS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN IV.

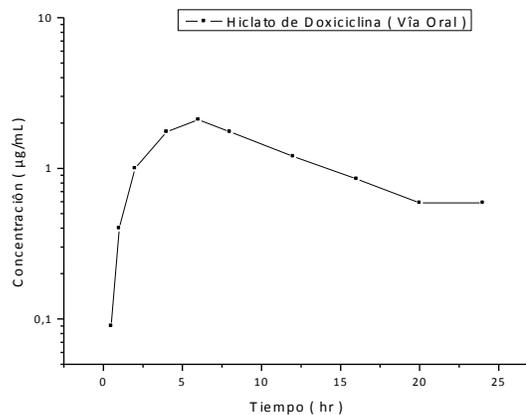


**Figura 18.** Farmacocinética en perros (machos y hembras) después de la administración Intravenosa, a una dosis de 10 mg/kg de doxiciclina en solución

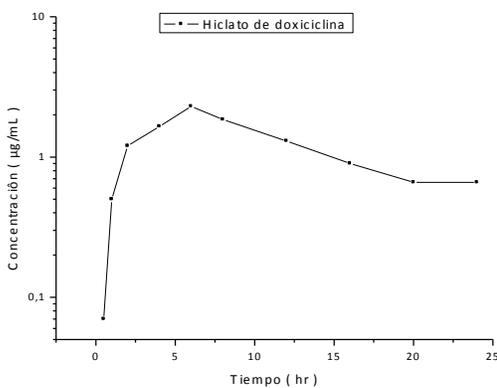
#### 8.4.8 RESULTADOS FARMACOCINÉTICOS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN PO DE UNA SOLUCIÓN ACUOSA DE HICLATO DE DOXICICLINA EN PERRAS CLINICAMENTE SANAS.



**Figura 19.** Farmacocinética en perro (hembra 1) después de la administración oral en tableta, a una dosis de 10 mg/kg de hiclato de doxiciclina.

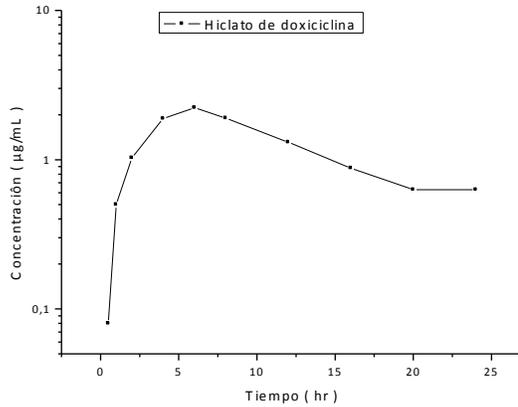


**Figura 20.** Farmacocinética en perro (hembra 2) después de la administración oral en tableta, a una dosis de 10 mg/kg de hiclato de doxiciclina.

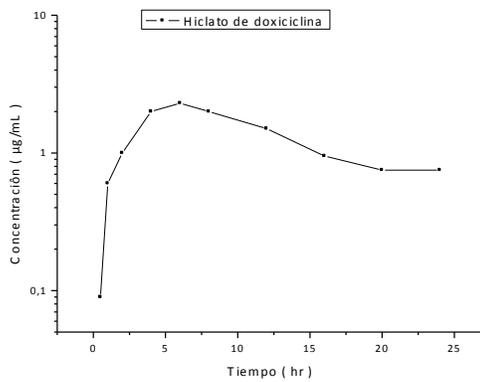


**Figura 21.** Farmacocinética en perro (hembra 3) después de la administración oral en tableta, a una dosis de 10 mg/kg de hiclato de doxiciclina.

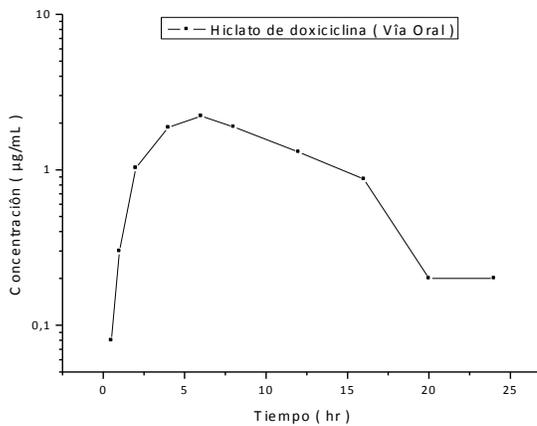
8.4.9 RESULTADOS FARMACOCINÉTICOS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN PO DE UNA SOLUCION ACUOSA DE HICLATO DE DOXICICLINA EN PERROS CLINICAMENTE SANOS.



**Figura 22.** Farmacocinética en perro (macho 1) después de la administración oral en tableta, a una dosis de 10 mg/kg de hiclato de doxiciclina.

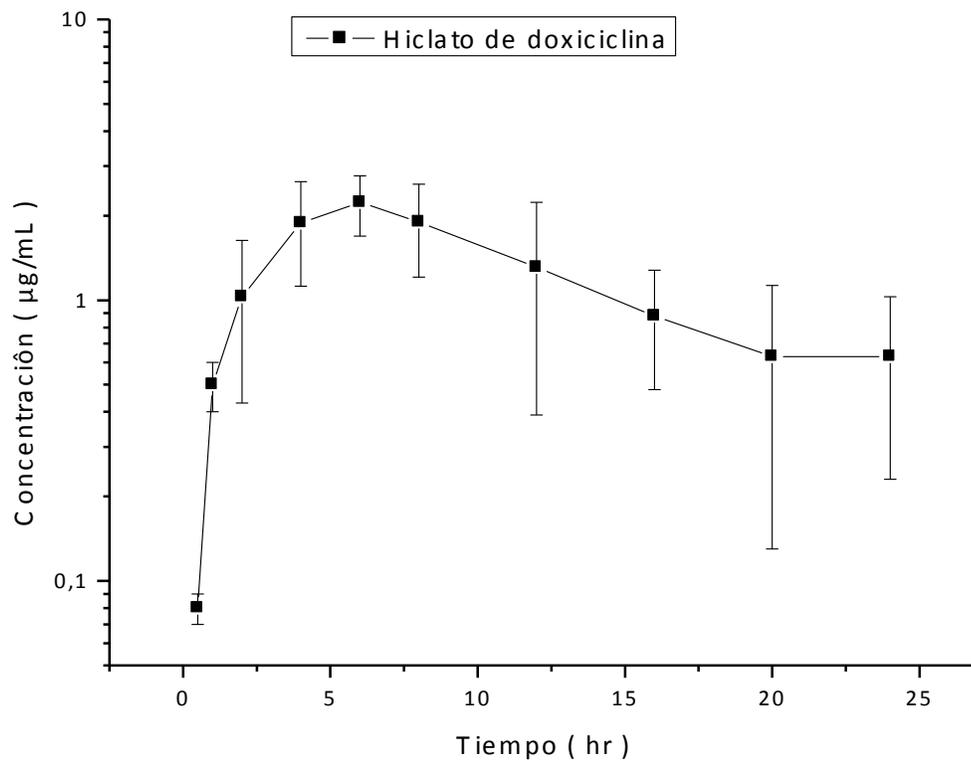


**Figura 23.** Farmacocinética en perro (macho 2) después de la administración oral en tableta, a una dosis de 10 mg/kg de hiclato de doxiciclina.



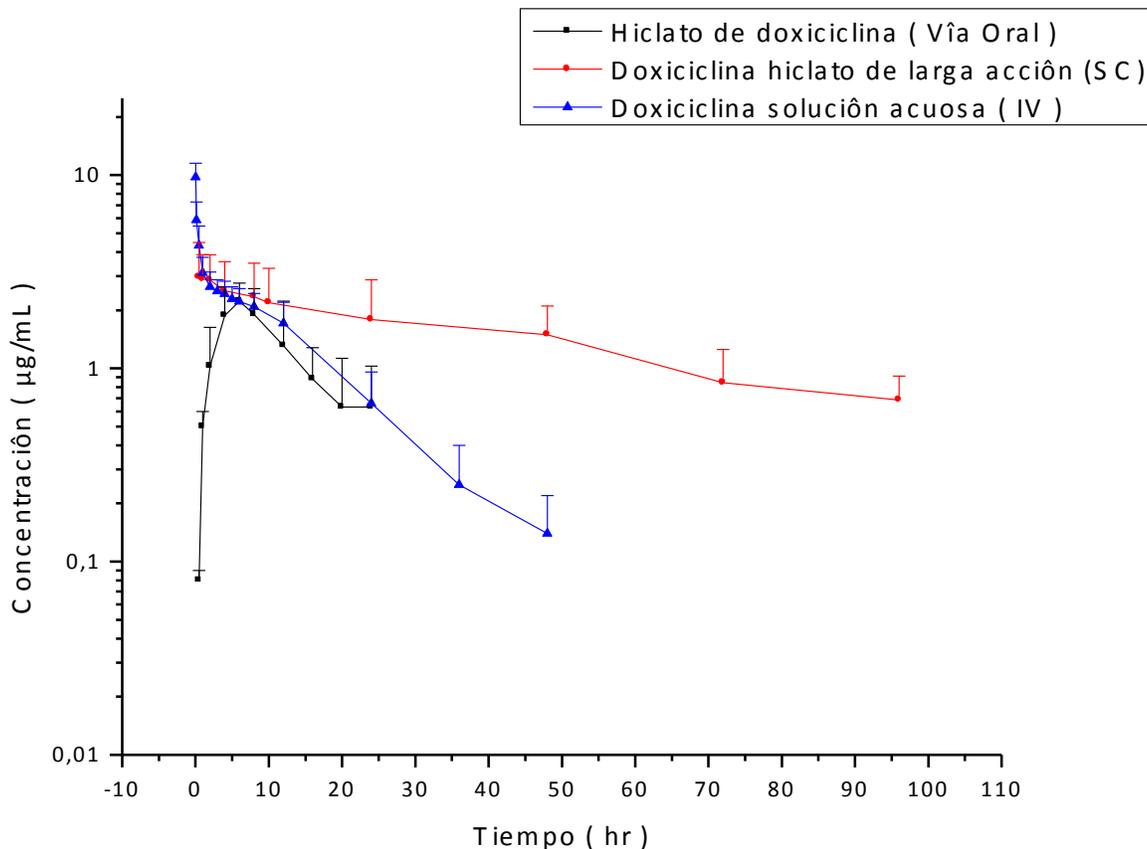
**Figura 24.** Farmacocinética en perro (macho 3) después de la administración oral en tableta, a una dosis de 10 mg/kg de hiclato de doxiciclina.

8.4.10 PROMEDIOS FARMACOCINÉTICOS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN PO DE UNA SOLUCIÓN ACUOSA DE HICLATO DE DOXICICLINA EN PERROS CLINICAMENTE SANOS.



**Figura 25.** Farmacocinética en perros (macho y hembras) después de la administración oral en tableta, a una dosis de 10 mg/kg de hiclato de doxiciclina.

8.4.11 RESULTADOS FARMACOCINÉTICOS, EN PERROS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE LOS PREPARADOS DE HICLATO DE DOXICICLINA Y DEL PREPARADO EXPERIMENTAL DOXICICLINA HICLATO DE LARGA ACCION (DOX-h-LA)



**Figura 26 .** Farmacocinética en perros (macho y hembras) después de la administración oral en tableta, a una dosis de 10 mg/kg de hiclato de doxiciclina.,por vía oral , intravenosa y subcutánea. En esta gráfica cada punto representa el promedio de las concentraciones alcanzadas por intervalo de tiempo en horas para cada una de las presentaciones farmacológicas de Doxiciclina, y cada barra son las desviaciones estandar.

## 8.5 VALORES FARMACOCINÉTICOS

**Cuadro 3.**

**VARIABLES FARMACOCINETICAS CALCULADAS PARA DOXICICLINA ( 10 mg/mL) EN PERROS A TRAVÉZ DE UN ANALISIS COMPARTAMENTAL.PREPARADO DE TABLETA Y UN PREPARADO EXPERIMENTAL DE LARGA ACCIÓN RSPECTIVAMENTE DESPUÉS DE SU ADMINISTRACIÓN IV, PO Y SC. DE UNA SOLUCION , UN**

	DOXICICLINA IV	DOXICICLINA PO	DOXICICLINA SC
	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD
AUC <sub>0-∞</sub> (µg·h/mL)	91.04 ± 17.24 <sup>a</sup>	70.08 ± 6.4 <sup>b</sup>	129.07 ± 12.52 <sup>c</sup>
AUMC (µg·h <sup>2</sup> /mL)	1107.5 ± 124.23 <sup>a</sup>	819.99 ± 36.71 <sup>b</sup>	10453.21 ± 134.57 <sup>c</sup>
MRT (h)	11.19 ± 6.4 <sup>a</sup>	9.56 ± 0.21 <sup>b</sup>	153.36 ± 11.49 <sup>c</sup>
T <sup>1/2</sup> <sub>α</sub> (µg/mL·h)		3.70 ± 0.14 <sup>a</sup>	3.37 ± 0. <sup>2b1</sup>
T <sup>1/2</sup> <sub>β</sub> (µg/mL·h)	0.19 ± 0.05 <sup>a</sup>	3.70 ± 0.09 <sup>b</sup>	119.91 ± 1.27 <sup>c</sup>
T <sup>1/2</sup> <sub>ab</sub> (h)		0.89 ± 0.03 <sup>a</sup>	3.37 ± 0.23 <sup>b</sup>
K <sub>el</sub> (h <sup>-1</sup> )		0.09 ± 0.003 <sup>a</sup>	0.02 ± 0.004 <sup>b</sup>
Vd <sub>AUC</sub> (mL/kg)	2.53 ± 0.24 <sup>a</sup>	3.12 ± 0.4 <sup>b</sup>	1.69 ± 0.1 <sup>c</sup>
Cs <sub>0</sub> (µg/mL)	23.54 ± 4.32		
C <sub>max</sub> (µg/mL)	-	5.3 ± 0.5 <sup>a</sup>	2.8 ± 0.3 <sup>b</sup>
T <sub>max</sub> (h)		3.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	2.11 ± 0.12 <sup>b</sup>
F (%) <sup>*</sup>	-	76.97	141.21

<sup>a, b, c, d</sup> Valores dentro de una misma fila con diferente exponencial difieren significativamente (P < 0.05).

\* Promedio

Área bajo la curva (AUC), Área bajo la curva el primer momento de concentración tiempo (AUMC); Área bajo la curva al infinito (AUC<sub>1</sub>),Tiempo medio de permanencia (MRT), Constantes de la fase de distribución (a) y eliminación (b), Vida media de eliminación (T<sub>1/2b</sub>), Vida media de absorción (T<sub>1/2ab</sub>), Constante de eliminación (K<sub>elim</sub>), Constante de absorción (K<sub>ab</sub>),Concentración máxima (C<sub>max</sub>),Tiempo máximo (T<sub>max</sub>), Concentración sérica máxima al tiempo 0 (C<sub>S0</sub>),(F) biodisponibilidad.

## DISCUSIÓN

El método analítico empleado se basa en la actividad antimicrobiana expresada en términos de cantidad.<sup>102</sup> De esta manera las concentraciones pueden correlacionarse directamente con la farmacocinética y brindar de esta manera una visión del potencial clínico, de este preparado en experimentación. La cantidad de los datos cuantitativos es buena en virtud de que se hizo una validación previa del método con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y presentó un límite de detección de 0.07 µg/mL – 0.1 µg/mL y un error intraensayo lo suficientemente bajo como para considerar los datos obtenidos aquí como confiables y repetibles.

Considerando lo anterior es factible proponer para la doxiciclina de larga acción un intervalo de dosificación de 5-7 días, dependiendo de las características del patógeno y de la enfermedad. A su vez este intervalo es factible que permita esquemas de dosificación que se ajusten más a lo requerido por las características PK/PD del fármaco. Esto es, se tienen con las DOX-h-LA concentraciones en o por arriba de la mínima inhibitoria, durante todo el intervalo de dosificación, esta característica es ideal para antimicrobianos tiempo dependientes.<sup>103</sup> Se ha comentado que uno de los índices más confiables para correlacionar PK/PD con eficacia clínica es el de AUC /CMI.<sup>104</sup> Aunque no existen datos precisos en Medicina Veterinaria se ha propuesto un rango de 40-70 AUC/CMI,<sup>105</sup> para esta proporción mencionada. En este ensayo el valor sobre AUC/CMI fue 140 lo que representa dos veces más que la sugerida y esto es predictivo de una mayor eficacia clínica. Sin embargo es necesario realizar estudios clínicos de largo plazo para definir esta propuesta ventaja clínica.

Los aspectos más delicados en el manejo DOX-h-LA es el posible daño en el sitio de inyección. La primera fase de este estudio permitió encontrar que volúmenes entre 0.03-0.5 mL por sitio inyección no inducían daño permanente. Si bien es cierto que se forma una masa ocupativa, la experiencia que dejó en estos 21 perros, es que existe un poco de dolor a la aplicación en comparación con otros medicamentos y si el volumen dicho no se sobrepasa es bien factible que no se genere una reacción local que pueda considerarse adversa. No obstante este estudio abre posibilidades de análisis para el preparado experimental. Por ejemplo la reacción en perros de talla chica ( menores de 5 kilos) quizá requiera la división de la dosis en por lo menos 2 sitios. De la misma manera en perros de tallas excesivamente grandes (arriba de 35 kilos) deberá ponderarse la necesidad de fraccionarse la dosis en varios sitios y apartarse una de los otros.

También se requieren estudios adicionales para determinar las reacciones de los sitios de inyección cuando se realiza aplicación en varios sitios, particularmente en la enfermedad de erlichiosis canina y leptospirosis cuyos esquemas de tratamiento pueden ser de varias semanas.<sup>62</sup> Por lo dicho anteriormente este medicamento deberá de ser manejado particularmente por el médico veterinario y no por personas no entrenadas.

Los estudios de hematología demuestran que no se observan alteraciones en este rubro, pero deben de realizarse estudios adicionales en virtud de que en este ensayo se utilizo una sola dosis. No obstante, existen datos en la literatura que validan que ni el poloxámero ni la ciclodextrina en las concentraciones indicadas generan toxicidad.<sup>106.</sup>

Si se considera el listado de patógenos del cuadro 3 es factible proponer que el preparado experimental DOX-h-LA, pueden ser utilizados en las enfermedades correspondientes, sin

embargo , es particularmente relevante destacar que la DOX-h-LA es el medicamento de elección para elchiosis canina, leptospirosis, enfermedades del árbol respiratorio, brucelosis canina y borreliosis.

## **CONCLUSIONES**

El preparado experimental inyectable DOX-h\_LA con el cual ya se contaba elaborado a base de la combinación de doxiciclina,β ciclodextrina y poloxamero, se determina que esta combinación evita el dolor y reduce irritación local en la aplicación subcutánea, además de presentar características propias de una liberación sostenida .

De acuerdo con los resultados obtenidos en la PK y en la eficacia farmacológica de la doxiciclina, ya se puede contar con un prospecto novedoso de DOX-h-LA para el uso parenteral en perros y cuyo intervalo de dosificación debe ser aplicado cada 5-7 días, sin que las CMI par bacterias sensibles caigan por debajo de las recomendadas. Sin embargo, otros estudios podrían optimizar el preparado experimental inyectable, y alargar los estudios de la β ciclodextrina y poloxamero ya que en investigaciones muestran evidencias que carecen de toxicidad en varias especies,<sup>99</sup> se debe de valorar y garantizar la seguridad de este preparado a la especie que va dirigido y además es necesario realizar evaluación de irritabilidad.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Riond JL and Riviere JE. Pharmacokinetics and toxicology of doxycycline. *Vet Hum Toxicol* 1988 ; 30: 431- 444.
2. Shaw DH and Rubin ST Pharmacology activity of doxycycline. *J. Am. Vet. Med. Assoc* 1986; 189: 808-810.
3. Suzuka I, Kaji H and Kaji A. Binding of specific sRNA to 30S ribosomal subunits: effects of 50S ribosomal subunits. *P Natl Acad Sci. USA* 1966; 55: 1483–1486.
4. Uekama K, Hirayama F and Irie T Cyclodextrin drug carrier systems. *Chem Rev* 1998; 98: 2045-2076.
5. Craig WA Pharmacokinetic-pharmacodynamic parameters: rationale for antibiotic use in mice and men. *Clin Infect Dis* 1988; 26: 1-12.
6. Prescott JF, Baggot DJ and Walker RD. Tetracyclines In: *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, third ed. Iowa State University Press/Ames.USA 2000: 275–289.
7. Prescott J, Miller R and Nicholson V. Isolation of *Leptospira hardjo* from kidneys of Ontario cattle at slung. *Can. J Vet Res* 1987; 51: 229-231.
8. Riond, JL and Riviere JE. Allometric analysis of doxycycline pharmacokinetic parameters. *J Vet Pharmacol Ther* 1990; 13: 404-407.
9. Waner T, Harrus S and Bark H. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. *Vet Parasitol* 1997; 69: 307-317.
10. Riond JL, Riviere JE. Pharmacology and Toxicology of doxycycline binding to plasma albumin of several species. *J Vet Pharmacol Ther* 1988 ; 12: 253-260.
11. Ole-Mapenay I M and Mitema ES. Aspects of pharmacokinetics of doxycycline given to healthy and pneumonic east African dwarf goats by intramuscular injection. *Vet Res Comm* 1997; 21: 453–462.
12. Vargas-Estrada D, Gracia-Mora J and Sumano H. Pharmacokynetic study of an injectable long-acting parenteral formulation of doxycycline hyclate in calves. *Res Vet Science* 2008; 84: 477-482.
13. Vargas D, Gutierrez L, Juarez I, Gonzalez F and Sumano H. Pharmacokinetic of an injectable long-action parenteral formulation of doxycycline hyclate in goats. *Am J Vet Res* 2009; 69: 1-6.
14. Errecalde JO. Uso racional de los antimicrobianos en el tambo. *Rev del Col de Vet de la Prov BS AS* 2007; 12(39) : 48-59.
15. Saunders GMP. *Handbook of veterinary drugs*. Philadelphia Pennsylvania 2002.

16. O'Brien TF. The Global epidemic nature of antimicrobial resistance and the need to monitor and manage it locally. *Clinical Infectious Disease* 1997; 2: 2-8.
17. Burns J. Mechanisms of bacterial resistance. *Pediatr Clin North America* 1995; 42: 497-507.
18. Heinemann J, Ankenbauer R & Amabile-Cuevas C. Do antibiotics maintain antibiotic resistance? *Drug Discovery Today* 2000; 5(5):195-204.
19. Aronson AL. Pharmacotherapeutics of the newer tetracyclines. *J Am Vet Med Assoc* 1980; 176: 1061-1068.
20. García AL, Oteo JA. Efectos no antimicrobianos de las Tetraciclinas: *Rev Esp Quimioterap* 2010; 23: 4-11.
21. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. México .D. F: SSA, 1999; 7.
22. Improving the Ethical Review Process. *Int.of Pharm Med* 1997; 11(3): 119.
23. Secretaría de Comercio y Fomento a la Industria. *Industria Farmacéutica en México*. Mexico. D.F.: SECOFI , 2000.
24. United States Pharmacopeia Drug Information for the Health Care professional. 15<sup>th</sup> edition. USA 1997; 1.
25. Novoa HG. Etica y reglamentación de la investigación clínica de medicamentos en México, *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 1999;30 (2): 32-34.
26. Spilker B. *Guide to clinical trials*. Raven Press. 1991.
27. Papich MG. The  $\beta$ -Lactam antibiotics: clinical pharmacology and recent developments. *Comp Equine* 1987; 9: 68-75.
28. Domenech J, Martínez J and Pla JM. *Biofarmacia y Farmacocinética Vol II*. Biofarmacia. Editorial Síntesis. España 1998.
29. Polishchuk AY and Zaikov GE. Multicomponent transport in polymer systems for controlled release Vol 3. Gordon and Breach Science Publishers. Amsterdam 1997.
30. Adams R. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*.USA, Iowa State University Press 1995.
31. Punch PI, Costa ND, Chambers ED, *et al*. Plasma and tear concentrations of antibiotics administered parenterally to cattle. *Res Vet Sci* 1985; 39 : 179-187.

32. Katzung BG. Farmacología Básica y Clínica. 4<sup>a</sup> edición. El Manual Moderno. México 1991.
33. Salazar MM, Sumano LH, Gracia MI. Bioequivalencia de cuatro marcas de oxitetraciclina. Veterinaria México 1995 ; 26 (3).
34. Breeze R and Gay C: Plasma levels of a long-acting oxytetracycline in cattle. Bovine Pract 1981; 16: 22-23.
35. Marcotty T, Billiouw M, Chaka G, et al. Immunisation against East Coast fever by the infection and treatment method: evaluation of the use of ice baths for field delivery and appraisal of an acid formulation of long-acting tetracycline. *Zambian Vet. J* 2000.
36. Davey LA, Ferber MT and Kaye B. Comparison of the serum pharmacokinetics of a long acting and a conventional oxytetracycline injection. *Vet Rec* 1985; 117: 426-429.
37. Terhune NT and Upson WD. Oxytetracycline pharmacokinetics, tissue depletion, and toxicity after administration of a long-acting preparation at double the label dosage. *JAVMA* 1989;194:911-917.
38. Rodríguez RMA, González-Piñera JG, Barreto PJ, Lim AN, Areu A y Pardo PNA. Tetraciclinas. *Acta medica* 1998; 8(1): 75-9.
39. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* . Jun 2001; 65(2):232-60
40. Plump DC: *Plub's Veterinary Drug Handbook*, fourth edition. Blackwell Publishing 2002: 229-232
41. Nakamura Y. Doxycycline. *Fish pathol.*1982;17: 67-76.
42. Beeman B , et al. Doxycycline inhibits collagen synthesis by bovine chondrocytes cultured in alginate. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997; 237: 107-110.
43. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EuCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection* 2003; 9 (8): 1-7.

44. Ganiere JP, Medaille C and Mangion C. Antimicrobial Drug Susceptibility of *Staphylococcus intermedius* Clinical Isolates from Canine Pyoderma. *J Vet Med B* 2005; 52: 25-31.
45. Guerin-Faublee, V Flandrois JP, Broye E, Tupin F and Richard Y. *Actinomyces pyogenes*: susceptibility of 103 clinical animal isolates to 22 antimicrobial agents. *Veterinary Research* 1993; 24: 251-259.
46. Pellerin JL, Bourdeau P, Sebbag H and Person JM. Epidemiological surveillance of antimicrobial compound resistance of *Staphylococcus intermedius* clinical isolates from canine pyodermas. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases* 1998; 21:115-133.
47. Pringle M, Landén A, Franlin A. Tiamulin resistance in porcine *Brachyspira pilosicoli* isolates. *Research in Veterinary Science*. Accepted 16 February 2005. ELSEVIER. Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
48. Traczewski MM and Brown SD. In Vitro Potency and Spectrum of Activity Compared to Ten Other Antimicrobial Compounds. The Clinical Microbiology Institute, Wilsonville. Oregon.
49. Yoshimura H, Ishimura M, Endoh YS & Kojima A. Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from cattle and pigs. *Journal Of Veterinary Medicine* 2001; 48:555-560.
50. Goren E, Jong WA, Doomenbal P, and Laurens T. Therapeutic efficacy of doxycycline hyclate in experimental *Escherichia coli* infection in broilers. *The veterinary Quarterly* 1998; 10 (1): 48-53.
51. Beale AS And Upshon PA. Characteristics of Murine Model of Genital Infection with Tetracyclines, Amoxicillin-Clavulanic Acid, or Azithromycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1994;38 (9): 1937-1943.
52. Dailloux M, Ottemer C, Albert H and Weber M. In vitro activity of antibiotics against *Chlamydiae*. *Pathologie Biologie* 1990; 38 (5): 426-430.
53. Jee JB, Degraevs FJ, Kim TY and Kaltenboeck B. High prevalence of natural *Chlamydia* species infection in calves. *Journal of clinical microbiology* 2004;42: 5664-5672.

54. Sangaré L, Morisset RM and Ravaoarinoro M. In vitro inhibition of *Chlamydia trachomatis* growth by liposome-encapsulated cyclones. *Pathologie* 2001; 49(1) : 53-56
55. Breitschwerdt EB, et al. Doxycycline hyclate treatment of experimental canine erlichiosis followed by challenge inoculation with two *Ehrlichia canis* strains. *Antimicrob Agents Chemother.*1998;42:362.
56. Anjaneyulu Y, Sasidhar N and James RM. Efficacy of commonly used antibiotic in bovine mastitis –a field study. *Indian Vet J* 1998;75: 460-461.
57. Boothe DM. Small animal clinical pharmacology and therapeutics. 1<sup>a</sup> ed. Saunders.USA.2001
58. Chopra I, Howe TGB, Linton KB, Richmond MH and Speller DCE. The Tetracyclines: prospects at the beginning of the 1980s. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1981;8: 5-21.
59. Suzuka I, Kaji H and Kaji A. Binding of specific sRNA to 30S ribosomal subunits: effects of 50S ribosomal subunits. *Proceedings of National Academy of Sciences.*1996;55: 1483-1486.
60. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* Jun 2001; 65 (2): 232-260.
61. United States Pharmacopeia Drug Information for the Health Care Professional. Vol.1,15<sup>th</sup> edition.USA 1997.
62. Rosenblatt JE, Brodie JL, et al: omparison of in vitro activity and clinical pharmacology of doxycycline with other tetracyclines.*Antimicrob Agent Chemother.* 1966; 134-141.

63. Meijer LA, Ceysens KGF, De Greve BI, De Bruijn W. Pharmacokinetics and bioavailability of doxycycline hyclate after oral administration in calves. *The veterinary Quarterly* 1993; 15:1-5.
64. Robert C Wilson, Douglas T, Kemp, Joseph V, Kitzman and Dennis D, Goetsch. Pharmacokinetics of Doxycycline in Dogs. *Can J Vet Res* 1988;52: 12-14.
65. Boker R. Analysis and quantitation of a metabolite of doxycycline in mice, rats, and humans by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1983; 274: 255-262.
66. Tasker RAR, Ross SJ, Dohoo SE, Elson CM Pharmacokinetics of an injectable sustained release formulation of morphine for use in dogs. *J Vet Pharmacol Ther* 1997; 20: 362-367.
67. Vomand KC and Sumano,LH. Adverse drug reactions in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*.1990; 197: 899-905.
68. Rathbone MJ and Gurny R. *Controlled Release veterinary Drug Delivery* 1<sup>a</sup> ed. Elsevier. Amsterdam 2000.
69. EMEA. The European Agency for the evaluation of medicinal Products veterinary Medicines Evaluation Unit. Comitee for veterinary medicinal Products. Doxycycline . EMEA/MRL/270/97-FINAL-corrigendum.October 1997.
70. Agwuh KN, MacGowan A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycyclines. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Aug;58(2):256-65.
71. Haerdi-Landerer C, Maja M, Suter, Steiner A, Max M,Wittenbrink, Pickl A and Gander BA. In vitro cel compatibility and antibacterial activity of microencapsulated

- doxycycline designed for improved localized therapy of septic arthritis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008; 61: 332–340.
72. Zetner K, Rothmueller G. Treatment of periodontal pockets with doxycycline in Beagles. *Veterinary Therapeutics* 2002; 3(4): 441-452.
73. Vaden, S and Papich M. 1995. Empiric Antibiotic Therap. *Kirk's Current Veterinary Therapy: XII*. Edited by Bonagura J. Philadelphia. W.B.Saunders. 276-280.
74. Boothe DM Treatment of Bacterial Infections. *Small Animal Clinical Pharmacologic*. Edited by Boothe MD. WB. Saunders Company. USA 2001: 175-221.
75. Greene R. Canine Erlichiosis : Clinical implications for humoral factors. *Kirk's Current Veterinary Therapy: XII*. Edited by Bonagura J. Philadelphia. W.B.Saunders. 1995; 2 : 90-230.
76. Lappin M.R . Infectious Diseases. In : *Small Animal Internal Medicine*. Third Edition. Edited by Nelson r.W.& Couto C.G. Missouri. Mosby 2003. 1229-1306.
77. Appel M & Jacobson R. 1995. CVT Update: Canine Lyme Disease. *Kirk's Current Veterinary Therapy: XII*. Edited by Bonagura J; Philadelphia. W.B.Saunders .303-309.
78. Beekman B et al. Doxycycline inhibits collagen synthesis by bovine chondrocytes cultured in alginate. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997; 237: 107-110.
79. Cunha, B.A, Domenico P. and Cunha C.B. Pharmacodynamics of doxycycline . *Clinical Microbiology and Infection* 2000: 6 (5): 270-273.
80. Bousquet E, et al, Comparative in vitro activity of doxycycline and oxytetracycline against porcine respiratory pathogens. *Vet Rec* 1997;12: 37- 40.

81. Waites K, Crabb D. and Duffy L. Inhibitory and bactericidal activities of gemifloxacin and other antimicrobials against *Mycoplasma pneumoniae*. *International Journal of antimicrobial agents*. 21 (2003) 574-577.
82. Bisky I, Major A, Fodor L, Szenci O and Vetési F. In vitro sensitivity of Hungarian *actinobaculum suis* strains to selected antimicrobials. *Acta Veterinaria Hungarica*. 2003; 51 (1): 53-59.
83. Hunfeld KP, Bittner T, Rodel R, Brade V and Cinatl J. New real-time PCR-based method for in vitro susceptibility testing of *Anaplasma phagocytophilum* against antimicrobial agents. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2004;23 (6): 563-571.
84. Hospenthal D and Murray C. In vitro susceptibilities of seven *Leptospira* species to traditional and newer antibiotics. *Antimicrobial agent and chemotherapy* 2003; 47 (8) :2646-2648.
85. Sicklinger M, Wienecke R, and Neubert U, In vitro susceptibility testing of four antibiotics against *Borrelia burgdorferi*: a comparison of results for the three genospecies *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, and *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. *Journal of clinical microbiology*. Apr. 2003:1791-1793.
86. Lawrence MJ. Surfactant systems microemulsions and vesicles as vehicles for drug delivery. *European journal of drug and pharmacokinetics* 1994;19: 257-259.