



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL

**“DISEÑO Y EVALUACIÓN FARMACOCINÉTICA Y
CARDIOTOXICOLÓGICA DE UN PREPARADO DE TILMICOSINA
DE LARGA ACCIÓN EXTENDIDA EN BOVINOS”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
PRESENTA

ZAHUINDANDA RODRIGO SORIANO LOZANO

TUTOR PRINCIPAL

HÉCTOR SALVADOR SUMANO LÓPEZ

COMITÉ TUTORAL

LILIA GUTIÉRREZ OLVERA

FERNANDO OSNAYA GALLARDO

México, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

A Dios.

A mi familia, especialmente a mis padres y hermanas.

A mis amigos por apoyarme y darme ánimos en todo momento.

A mis maestros.

Agradecimientos

Al CONACYT por la beca otorgada para la realización de la presente tesis.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FES-C), al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Agro-Silvo Pastoril (CEIEPASP) de la UNAM, por brindarme un espacio para el desarrollo de la investigación.

Al Dr. Héctor Salvador Sumano López por orientarme en esta investigación.

A la Dra. Lilia Gutiérrez Olvera por su valioso apoyo en el desarrollo de la tesis.

Al Dr. Fernando Osnaya Gallardo por estar siempre disponible y su asesoría en el desarrollo de la tesis.

A la Dra. Dinorah Vargas Estrada por su asesoría en el laboratorio.

A la M en C, IQ Fernanda Hernández Gil por su apoyo.

A mis compañeros del Departamento de Fisiología y Farmacología por su valiosa ayuda.

A mi jurado

Al Dr. Rene Rosiles Martínez por la revisión de la tesis.

A la Dra. María Josefa Bernad Bernad por sus críticas y sugerencias.

A la Dra. Flora Adriana Ganem Rondero por sus comentarios para mejorar el trabajo.

Al Dr. Alfonso Dueñas González por sus comentarios.

Resumen

El denominado complejo respiratorio bovino (CRB) es responsable de grandes pérdidas económicas en el ganado bovino. Existen al menos unas diez opciones antibacterianas para tratarlo, No obstante se reconoce que la tilmicosina es una de las mejores. Esto se debe a las características de inmunomodulación, propiedades antiinflamatorias y amplia actividad antimicrobiana de este antibacteriano que, en conjunto dan lugar a un fármaco con excepcional capacidad para resolver infecciones del CRB. Un defecto es su potencial cardiotoxico a partir de dosis de 30 mg/kg en bovinos. De tal manera que para administrar una dosis de esa magnitud, se debe desarrollar un sistema matricial con polímeros que generen una liberación prolongada, que no permita alcanzar una dosis cardiotoxica. Dada su farmacodinamia y su farmacocinética (relación PK/PD), se le considera un antibacteriano dependiente del tiempo y por ello se planteó como objetivo de este trabajo elaborar un preparado que generará concentraciones pico similares a las obtenidas con el referente (Micotil® de ELANCO Animal Health), pero que brindara, al menos el doble del tiempo, (4 – 5 días) las concentraciones séricas obtenidas con el referente. Dentro de los objetivos se planteó evaluar tanto su farmacocinética como su cardiotoxicidad y la tolerancia local de los prototipos en ensayo y comparar los datos con la farmacocinética del preparado de referencia. El preparado experimental A de tilmicosina (Til-Exp-A), basado en el poloxamero 188 como matriz polimérica administrado a 30 mg/kg, resultó ser el que mejor relación PK/PD ofrecía y generó una concentración sérica máxima (Cmax) de $3.25 \pm 0.59 \mu\text{g/mL}$ vs. $1.08 \pm 0.18 \mu\text{g/mL}$ del referente a dosis de 10 mg/kg. El tiempo para lograr la Cmax (Tmax) ocurrió a las $4.01 \pm 0.78 \text{ h}$ en el primer caso y a las $3.06 \pm 0.36 \text{ h}$ con el referente. Después de la Cmax, las concentraciones séricas de tilmicosina tienden a decaer muy lentamente con una vida media de eliminación ($T_{1/2\beta}$) de $35.26 \pm 0.06 \text{ h}$ vs. $14.08 \pm 0.39 \text{ h}$ del referente. En concordancia el tiempo medio de retención (MRT), se puede postular que se logró un preparado LA con cinética *flip-flop* para Til-Exp-A, con un MRT de $52.32 \pm 0.06 \text{ h}$ vs $21.31 \pm 0.28 \text{ h}$ del referente. No se generaron cambios electrocardiográficos en los bovinos tratados con el prototipo Til-Exp-A. Sin embargo, para incorporar a este prototipo a la clínica es necesario validar su eficacia en casos de CRB y realizar estudios toxicológicos de cardiotoxicidad adicionales, por ejemplo mediante el seguimiento de marcadores séricos bioquímicos cardiacos, como la creatinofosfoquinasa sérica total; lactodeshidrogenasa y las transaminasas glutámica y oxalacética, así como la determinación de tiempos de retiro de rastro.

Palabras clave: complejo respiratorio bovino, tilmicosina, cardiotoxicidad, liberación modificada, farmacodinamia, farmacocinética.

Abstract

The so-called bovine respiratory complex (BRC) is a key cause of great economical losses in the bovine meat industry. There are at least ten viable antibacterial options to treat this disease complex. However, it is well recognized that tilmicosin is among the best. This is due to its immunomodulatory properties, as well as its anti-inflammatory and antibacterial effects. Together these properties make tilmicosin an exceptional drug choice to treat bacterial infections of the BRC. A flaw in its mechanism of action is its potential cardiotoxicity when approaching a dose of 30 mg/kg in cattle. Therefore, to administer a dose of such magnitude a matrix-based delivery-absorption system must be developed, with polymers so as to obtain a prolonged release, does that not allow reaching that dose cardiotoxic. Considering its pharmacokinetics – pharmacodynamics (PK/PD ratios) as a time-dependant drug, the aim of this work was to design a polymer-based pharmaceutical preparation capable of delivering maximum serum concentrations similar to the ones obtained with the reference preparation (Micotil® de ELANCO Animal Health); yet, capable of extending serum concentrations to twice the expected time of the reference preparation (4 – 5 days). Hence, among the objectives of this work, pharmacokinetics and cardiotoxicity, as assessed with electrocardiography, as well as local tissue tolerance were assessed and compared with those achieved with the reference pharmaceutical preparation. The experimental preparation Til-Exp-A, based on poloxamer 188 as polymeric matrix gave the best PK/PD ratios with a maximum serum concentration (C_{max}) of $3.25 \pm 0.59 \mu\text{g/mL}$ vs. $1.08 \pm 0.18 \mu\text{g/mL}$ of the reference preparation at 10 mg/kg. Time to reach C_{max} (T_{max}) was $4.01 \pm 0.78 \text{ h}$ for the former and $3.06 \pm 0.36 \text{ h}$ for the latter preparations. After C_{max}, serum concentrations of tilmicosin slowly decreased with an elimination half-life (T_{1/2β}) of $35.26 \pm 0.06 \text{ h}$ vs. $14.08 \pm 0.39 \text{ h}$ for the experimental and reference drug-preparation respectively. In accordance with the mean residence time (MRT), it is possible to state that for Til-Exp-A, an extended LA preparation was obtained with a *flip-flop* pharmacokinetics and MRT of $52.32 \pm 0.06 \text{ h}$ vs $21.31 \pm 0.28 \text{ h}$ for the reference drug-preparation. This experimental preparation did not cause electrocardiographic variations. However, to incorporate this tilmicosin-preparation into bovine clinical work, assessment of its efficacy in field outbreaks of BRC is mandatory, as well as the full evaluation of its potential cardiac toxicity, for example through the follow up of serum markers such as total serum creatine phosphokinase; lactic dehydrogenase and glutamic and oxalacetic transaminase activities, as well as kidney and liver function, and after the determination of the withdrawal times.

Key words: bovine respiratory complex, tilmicosina, cardiotoxicity, long action, pharmacokinetic, pharmacodynamic.

CONTENIDO

	Página
1. Introducción	1
1.1. Principales enfermedades que afectan a los bovinos	1
1.1.1. Terapia antimicrobiana	3
1.1.2. Relación farmacocinética/farmacodinamia (PK-PD)	4
1.1.2.1. Fármacos utilizados en el CRB	5
1.1.2.1.1. Generalidades de los macrólidos	7
1.2. Tilmicosina	8
1.3. Sistemas de liberación de fármacos	13
1.3.1. Características de los excipientes	18
1.3.1.1. Poloxameros	18
1.3.1.2. Propilenglicol: 1,2-propilenglicol (PG)	19
1.3.1.3. Pirrolidona	20
2. Planteamiento del problema	21
3. Justificación	22
4. Hipótesis	23
5. Objetivos	24
6. Material y métodos	25
6.1 Fase 1: Investigación documental	27
6.2 Definición del proyecto y protocolo de pre formulación	30
6.3 Fase 2: Pruebas de laboratorio: pre formulación	32
6.4 Estudios <i>in vivo</i>: ratas	40
6.4.1 Fase 3 de campo: Estudio farmacocinético en bovinos en las instalaciones del CEIEPASP	42
6.4.2 Fase 3 de campo: Estudio farmacocinético en bovinos en las instalaciones de la FES-C	44

6.5 Determinación de las concentraciones séricas de tilmicosina en ratas y bovinos	46
7. Resultados	49
7.1 Cardiotoxicidad en ratas	49
7.2 Farmacocinética y cardiotoxicidad en bovinos	50
8. Discusión	63
9. Cuadros y figuras	72
10. Literatura citada	82

Lista de figuras

Figura	Página
1. Clasificación de los macrólidos	72
2. Estructuras de algunos macrólidos	73
3. Fórmula estructural de la Tilmicosina	74
4. Fórmula estructural del poloxamero 188	74
5. Fórmula estructural del propilenglicol	75
6. Metabolismo de la fosforilación del Propilenglicol en mamíferos	75
7. Metabolismo del propilenglicol en mamíferos	75
8. Estructura de pirrolidona	76
9. Diagrama de flujo de la investigación	26
10. Curva de recuperación de tilmicosina en suero	51
11. Concentraciones séricas de los preparados experimentales y el fármaco referente en ratas utilizando una dosis de 30 mg/kg/SC	53
12. Concentraciones séricas de los preparados experimentales y el fármaco referente, en ratas utilizando una dosis de 100 mg/kg/SC	55
13. Concentraciones séricas de tilmicosina vía SC en bovinos del CEIEPASP	57
14. Concentraciones séricas de tilmicosina vía SC en bovinos de la FES-C	59
15. Fotografía de uno de los animales experimentales en el que resulta evidente la masa ocupativa que genera el preparado Til-Exp-A	60
16. Fotografía que muestra una reacción inflamatoria superpuesta a la masa ocupativa del preparado Til-Exp-E	61
17. Fotografía de uno de los animales experimentales en el que se muestra el edema en el pecho, después de la aplicación del prototipo Til-Exp-E	62
18. Trazo electrocardiográfico basal y 2 horas después de la aplicación del preparado Til-Exp-A	63
19. Trazo electrocardiográfico basal y 2 horas después de la aplicación del preparado Til-Exp-B	63

Lista de cuadros

Cuadro	Página
1. Diferencias en el aparato respiratorio de varias especies	77
2. Clasificación general de fármacos sobre su actividad antibacteriana	77
3. Concentración mínima inhibitoria de tilmicosina para algunos microorganismos	78
4. Ejemplos de los efectos antiinflamatorios de los macrólidos	79
5. Parámetros farmacocinéticos de tilmicosina	80
6. Vehículos usados en formulaciones de antibióticos de larga acción	81
7. Variables farmacocinéticas de los preparados experimentales y el fármaco referente en ratas a dosis de 30 mg/kg/SC	52
8. Variables farmacocinéticas de los preparados experimentales y el fármaco referente en ratas a dosis de 100 mg/kg/SC	54
9. Variables farmacocinéticas de los preparados experimentales y el fármaco referente en bovinos del CEIEPASP	56
10. Variables farmacocinéticas de los preparados experimentales y el fármaco referente en bovinos de la FES-C	58

DISEÑO Y EVALUACIÓN FARMACOCINETICA Y CARDIOTOXICOLOGICA DE UN PREPARADO DE TILMICOSINA DE LARGA ACCIÓN EXTENDIDA EN BOVINOS.

1. Introducción

Los productores de ganado se enfrentan a un desafío cada vez mayor en la producción suficiente de carne de alta calidad y asequible a sus costos para satisfacer la necesidad que genera una población creciente (Capper, 2011). De acuerdo con la FAO (2009), la población mundial de ganado vacuno en el 2004 era de 1,339 millones de cabezas de las cuales el 33.2% se localizaban en Asia, el 36.4% en América, el 17.5 en África, el 10.1% en Europa y el 2.7% en Oceanía. Es factible pensar que el continente Americano ocupa aún el primer lugar en población bovina junto al continente Asiático, con un gran potencial de crecimiento. La población de bovinos en el continente Americano es de 476 millones correspondiendo el 70% a Argentina, Brasil, Colombia, Chile, México, Paraguay, Perú y Uruguay. Es predecible comentar que la ganadería bovina representa una de las principales actividades económicas en esos países. En México datos del Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera (SIAP) dependiente de la Secretaria de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), reporta para el 2010, un total de 32,642,134 cabezas de ganado dedicadas a la producción de carne y leche, 30,267,511 para la producción de carne y 2,374,623 para la producción de leche.

1.1. Principales enfermedades que afectan a los bovinos

El ganado de engorda se enfrenta a diversas enfermedades, la prevalencia de éstas, se ve influida por muchos factores entre los que destacan, el clima, el estrés y microorganismos patógenos (Hartel *et al.*, 2004; Smith, 2004). Los animales alojados en corrales de engorda son principalmente susceptibles a las infecciones sobre todo las respiratorias y en los bovinos productores de leche aparte de las respiratorias, la mastitis, la metritis y las enfermedades metabólicas. Obviamente son menos amenazados por otras enfermedades funcionales e intoxicaciones, debido a su edad y ambiente controlado, respectivamente.

En contraste el constante movimiento de ganado dentro y fuera de corrales de engorda hace difícil al control de las enfermedades infecciosas, la exposición a agentes patógenos es inevitable y el estrés facilita que se manifiesten. Además, el ganado en corrales de engorda llega con una amplia variación de antecedentes y algunos se han facultado de manera que pueden soportar los rigores de la adaptación a la vida de engorda, mientras que otros son muy susceptibles a cualquier exposición a la enfermedad (Smith, 2004). Dentro de las principales enfermedades de los bovinos dedicados a la producción de carne, según la OIE, (2011), se encuentran las de tipo respiratorio, denominado genéricamente como complejo respiratorio bovino.

El complejo respiratorio bovino (CRB) es el responsable de las mayores pérdidas económicas en el ganado lechero y de engorda (Fodor *et al.*, 2000). El CRB recibe este nombre dado que están implicados más de un microorganismos. Se han aislado *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus sommi*, *Mycoplasma spp* y algunos virus (Forbes *et al.*, 2011). También contribuyen factores como el estado inmunológico del animal, la carga bacteriana del lugar y la virulencia. Resulta claro que las condiciones ambientales, las del transporte entre el centro de acopio y el destino final donde se les engorda con una alta densidad de población y la mezcla de animales de diferentes edades y diferentes fuentes predispone a los bovinos a las enfermedades respiratorias (Fodor *et al.*, 2000; Tadich *et al.*, 2003; Nickell y White, 2010). Es por esto que utilizar un tratamiento dirigido a un solo agente bacteriano o la corrección de un solo riesgo de enfermedad no elimina el problema. Se debe evaluar el programa completo de manejo utilizado en los animales a fin de mantener la expectativa de disminuir el impacto del CRB en la productividad del hato (White, 2008).

Por otro lado, es importante resaltar que las características anatómicas de las vías respiratorias de los bovinos parecen ser un punto débil en esta especie. La ausencia de una ventilación colateral, interalveolar e interbronquial, la alta tasa de ventilación y la fuerte resistencia del flujo de aire dentro del conducto respiratorio hace a los bovinos más susceptibles a las enfermedades respiratorias. Algunas de estas deficiencias se ven

exacerbadas en los animales jóvenes (Valarcher y Hagglun, 2006). Las diferencias más destacables entre el aparato respiratorio del bovino y otras especies como comparativo se presentan en el cuadro 1.

Queda claro que una de las determinantes más importantes de la eficacia de los antimicrobianos en el tratamiento del CRB es alcanzar y mantener una concentración efectiva en el sitio de la infección ya que es un hecho comprobado que los cambios bruscos de temperatura, modifican el movimiento ciliar de las células epiteliales de revestimiento de: tráquea y bronquios. Uno de los mecanismos locales de defensa de las vías respiratorias bajas y altas, es la movilización del moco vertido a las superficies lumbinales hacia un solo punto; la nasofaringe. Al no moverse el moco, los mecanismos de arrastre de las bacterias que se fijan al mismo, facilitan la proliferación bacteriana, cuyo destino de destrucción por el ácido clorhídrico del estómago se ve perturbado. La exposición a humos y polvos, afecta directamente la movilización y funciones de los macrófagos alveolares, células cuya eficiencia en el desahogo de colonización bacteriana en las áreas bajas de las vías respiratorias, está bien reconocida (Tizard, 2002).

Esto es, en el tejido enfermo del parénquima en el árbol respiratorio posterior, especialmente en la región anteroventral del pulmón (Constable *et al.*, 2008).

1.1.1. Terapia antimicrobiana

El uso de antibióticos en el CRB puede clasificarse en términos generales, como terapéutico o preventivo. El uso terapéutico describe la administración a animales individuales que están mostrando signos clínicos de enfermedad respiratoria probablemente infecciosa, mientras que el uso preventivo, que también se conoce como metafiláctico implica el tratamiento de los grupos de animales que se consideren de alto riesgo de desarrollar CRB o estar en etapas preclínicas (Catry *et al.*, 2008). En el uso terapéutico, la actividad antibiótica debe resultar útil durante el curso de la enfermedad clínica y su efecto debe evitar que se produzcan recaídas y que permita que el bovino tenga tiempo de resolver las lesiones neumónicas. Esto se puede lograr ya sea por la

administración repetida de los productos de acción corta o una administración única de un producto de larga acción y con una eficacia persistente. Cuando los antibióticos se utilizan de forma preventiva, la situación clínica exacta de cada animal en el grupo en el momento del tratamiento no se conoce, algunos pueden estar incubando la enfermedad mientras que otros no están infectados. Por lo tanto, hay un valor en la prescripción antibiótica durante un periodo prolongado para que los animales que todavía no se han infectado estén protegidos de la enfermedad más tarde (Forbes *et al.*, 2011).

Con el uso de inyecciones, el veterinario puede estar seguro de que los animales reciben la dosis adecuada, con un mejor control sobre el régimen de medicación que por vía oral, misma que es de poca utilidad para este propósito en bovinos (Fodor *et al.*, 2000).

Según Carrington (2006), la decisión de utilizar un determinado antibiótico para tratar el CRB depende de una serie de factores entre los que destacan: las bacterias aisladas y sus patrones de susceptibilidad.

Algunos fármacos disponibles son: florfenicol, ceftiofur, oxitetraciclina, tilmicosina, tulatromicina y las fluoroquinolonas. Se debe ponderar obviamente la relación costo-beneficio, la vía de administración, una inyección intravenosa requiere más habilidad, mientras que la inyección intramuscular puede causar daños en la canal, la frecuencia de administración y es evidente que menos frecuente es lo preferido, el volumen de administración considerando que se prefieren volúmenes pequeños de inyección también se pondera la seguridad (tilmicosina puede ser fatal cuando se inyecta por vía intravenosa en el ganado o se administran por vía parenteral con otras especies, incluyendo seres humanos) y el tiempo de retiro (Constable *et al.*, 2008).

1.1.2. Relación farmacocinética/farmacodinamia (PK/PD)

La combinación de información PK/PD, de un fármaco nos ayuda a predecir un régimen de dosificación, según el enfoque PK/PD. Se ha encontrado para las situaciones clínicas que la eficacia máxima de un fármaco puede depender de que las concentraciones pico en plasma sean varias veces superiores a la concentración mínima inhibitoria (CMI) del

patógeno. Alternativamente para otros antimicrobianos, la eficacia puede depender del mantenimiento de las concentraciones en plasma justo encima de la CMI durante un tiempo prolongado. Para algunos grupos de medicamentos se ha encontrado que son importantes también una combinación de la concentración y un tiempo de exposición adecuado (Lees *et al.*, 2004). En términos cuantitativos los parámetros PK/PD que han sido más ampliamente investigados y para los cuales la mayoría de la información se encuentra actualmente disponible, son¹ AUC₀₋₂₄: CMI, un índice que se utiliza para las quinolonas, Cmax: CMI, un indicador para aminoglucósidos y T>CMI, que es el índice seleccionado para los antibióticos llamados tiempo-dependientes, como β -lactámicos y macrólidos (Toutain *et al.*, 2002; Lees *et al.*, 2004; Toutain y Bousquet-Melou, 2006). En el cuadro 2 se muestra la clasificación de los antibióticos.

1.1.2.1. Fármacos utilizados en el CRB

El florfenicol es un antibiótico de amplio espectro que pertenece a la familia de los fenicoles. El florfenicol es un derivado fluorado del tianfenicol y ninguno de estos dos posee grupo nitro por lo que no se ha demostrado que produzcan anemia aplásica. La potencia antibiótica del cloranfenicol es mayor a la del tianfenicol y la resistencia se produce por un mecanismo mayor que incluye la presencia de cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) en microorganismos resistentes. La modificación estructural del florfenicol que consiste en la sustitución de un átomo de flúor por un grupo hidroxilo en el carbono 3, previene la acetilación por parte de la CAT. Es por esto que *in vitro*, es más efectivo que el tianfenicol y cloranfenicol y muestra actividad contra las cepas resistentes a los otros fenicoles participantes en las infecciones más comunes en animales domésticos (Himelfarb *et al.*, 2007).

¹ AUC₀₋₂₄: Área bajo la curva de concentración vs tiempo
CMI: Concentración mínima inhibitoria
Cmax: Concentración plasmática máxima
T: tiempo

Quinolonas, desde comienzos de la década de los años 80, las fluoroquinolonas, se utilizan en medicina veterinaria. Son antibacterianos de amplio espectro que actúan mediante la inhibición de la replicación del ADN. En general, la resistencia surge en forma espontánea por medio de mutaciones puntuales que resultan en sustituciones de aminoácidos dentro de las subunidades GyrA, GyrB de ADN girasa y ParC o ParE de topoisomerasa IV, disminución de la expresión de porinas de membrana externa o sobreexpresión de bombas de salida (extrusión) para múltiples fármacos. Además, se ha postulado que la aparición reciente de un plásmido que media la resistencia a fluoroquinolonas produciría la transferencia horizontal de la resistencia entre cepas (Hopkins *et al.*, 2005).

La Oxitetraciclina es derivada de *Streptomyces spp.*, tiene amplio espectro de actividad contra muchas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas también contra muchos microorganismos patógenos que son resistentes a agentes antimicrobianos que inhiben la síntesis de la pared celular, incluyendo *Rickettsia*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia spp.* *Legionella spp.*, algunas micobacterias atípicas y *Plasmodium spp* (Fletouris y Papanagiotou, 2008).

El Ceftiofur cristalino es una cefalosporina de amplio espectro, beta-lactamasa resistente de tercera generación. Es activo contra *Escherichia coli*, *Haemophilus pleuropneumoniae*, *H. sommus*, *M. haemolytica*, *P. multocida*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*. El tiempo que las concentraciones de ceftiofur y del metabolito activo desfuroilceftiofur se mantienen por encima de 0.2 µg/ml en los tejidos blanco se utiliza rutinariamente como umbral terapéutico superior a la CMI para la mayoría de los patógenos hacia él. Este umbral se mantiene por lo menos 7-10 días y por lo tanto se predice una buena eficacia clínica. La forma farmacéutica del Ceftiofur ácido libre cristalino demuestra las propiedades terapéuticas de la liberación extendida y se ha desarrollado como un producto de administración única (Yancy *et al.*, 1987).

Los macrólidos tilmicosina y tulatromicina tienen bajas concentraciones en plasma que no logran concentraciones inhibitorias, sin embargo, sus concentraciones en los pulmones son considerablemente más altas que las concentraciones plasmáticas. Esto

aparentemente es una función de su acumulación en los macrófagos pulmonares (Moredo *et al.*, 2001). Puesto que la enfermedad respiratoria bovina es una enfermedad extracelular, donde las bacterias suelen invadir la superficie de los alvéolos pulmonares, ni las concentraciones plasmáticas ni las concentraciones de los macrófagos pulmonares describen completamente el perfil de concentración a la que las bacterias patógenas son expuestas. Claramente la correlación clásica de concentración plasmática contra eficacia no se ajusta e incluso la aplicación de tal correlación con las concentraciones pulmonares resulta poco satisfactoria para la predicción de la eficacia clínica. Algunos han sugerido que los efectos de modulación inmune de los macrólidos contribuyen a su eficacia, pero la extrapolación de las observaciones a cualquier relación matemática PK/PD ha sido difícil de lograr (Brown, 2005).

1.1.2.1.1. Generalidades de los macrólidos

Son un grupo de compuestos químicamente relacionados por la presencia de un anillo lactónico grande (macrocíclico) unido a dos azúcares. Los macrólidos pueden subdividirse en tilonidas como tilosina y tilmicosina; azalidos como la azitromicina; triamilidas como tulatromicina y cetolidos como la telitromicina (Giguere, 2006). La eritromicina, el antibiótico prototipo de esta clase fue aislado del *Streptomyces erythreus* en 1952 por McGuire y colaboradores (Clark, 2008). Los macrólidos se diferencian entre sí por su tamaño, poseen entre 12 y 16 átomos de carbono y el patrón de sustitución del anillo lactónico. La eritromicina es un integrante del grupo de 14 átomos, conjuntamente con oleandomicina y espiramicina. La azitromicina es del grupo de 15 átomos y la tilosina y la tilmicosina son macrólidos del grupo de 16 átomos, de origen natural y semisintético respectivamente. Estos últimos macrólidos ofrecen ventajas importantes sobre la eritromicina ya que poseen un espectro bacteriano más amplio, mejores características farmacocinéticas y menores efectos colaterales (Moredo *et al.*, 2001). Los cetólidos son la generación de más reciente introducción de los macrólidos. Se caracterizan por la sustitución del azúcar C3 cladinosa con un grupo ceto. Los cetólidos presentan un

aumento en los sitios de unión a los ribosomas en comparación con los macrólidos de generaciones anteriores (Gaynor y Mankin, 2003). Los macrólidos son considerados como agentes bacteriostáticos a concentraciones terapéuticas y solo son teóricamente bactericidas, especialmente contra estreptococos. En concentraciones tan bajas como un cuarto de la CMI todavía hay una disminución del crecimiento bacteriano. Aún en este caso, su acción bactericida se describe como tiempo-dependiente. La acción antimicrobiana de algunos macrólidos se ve reforzada por un pH alto y suprimida por un pH bajo, haciendo que sea menos eficaz en sitios con colección de pus, tejido necrótico o en la orina acida (Naccari *et al.*, 2003), en particular la tulatromicina por lo que se prefiere su uso como profiláctico antes que el tejido pulmonar y fluidos se acidifiquen por una infección. En la figura 1 se presenta un diagrama que clasifica a los macrólidos y en la figura 2 se presentan las estructuras de algunos macrólidos.

1.2. Tilmicosina

La tilmicosina es un antibiótico macrólido, producido sintéticamente por modificaciones de la desmicosina que ha estado disponible en los Estados Unidos desde 1992. La tilmicosina ha sido aprobada para el tratamiento de la enfermedad respiratoria asociada a *Pasteurella* y especies de *Mycoplasma* en ovinos, bovinos de carne y vacas productoras de leche en el periodo de secado. También se le aprobó en porcinos como aditivo de los alimentos para el control de enfermedades respiratorias asociadas con *Actinobacillus pleuroneumoniae* y *P. multocida* (Fodor *et al.*, 2000; Naccari *et al.*, 2001; Mestorino y Errecalde, 2004; USP, 2007) y en aves comerciales se usa en el agua de bebida. Es una base débil, su nombre químico es: tilosina, 4A-O-de (2,6-dideoxi-3-Cmetil-*alpha*-L-ribohexapiranosil)-20-deoxo-20-(3,5-dimetil-1-piperidinil)-,[20(*cis*)]-,fosfato(1:1)(Sal) (véase figura 3) . Es un polvo opaco con pKa: 7.4; 8.6 y peso molecular de: 967.13. Su fórmula condensada es: $C_{46}H_{80}N_2O_{13} \cdot H_3O_4P$ (USP, 2007).

La tilmicosina tiene actividad *in vitro* contra organismos gram-positivos y mycoplasmas y es activa contra ciertos organismos gram-negativos, tales como *Histophilus sommi*

(*Haemophilus somnus*), *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*. Sin embargo, *M. haemolytica* es más sensible que *P. multocida*. Otros organismos gram-negativos probados, incluyendo *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* y especies de *Serratia*, son muy resistentes a la tilmicosina. Algunas cepas de *Actinomyces* también son extremadamente resistentes a la tilmicosina (Mckellar, 2000; Naccari *et al.*, 2001; Naccari *et al.*, 2003; Mestorino y Errecalde, 2004). En el cuadro 3 se muestra la concentración mínima inhibitoria para algunos microorganismos.

La actividad antibacteriana de los macrólidos, es producida por la inhibición de la síntesis de proteínas por la unión del antibiótico en el ARN23S de la subunidad 50S ribosomal de los microorganismos procariotas. Los macrólidos inhiben la translocación del ARN de transferencia desde el punto aceptor del aminoácido, lo que impide la formación de un nuevo enlace peptídico, impidiendo así la síntesis de nuevas proteínas en la célula microbiana (Naccari *et al.*, 2001; Mestorino y Errecalde, 2004; Abu-Gharbien *et al.*, 2004; USP, 2007). Los macrólidos se unen a los ribosomas mitocondriales de la misma forma que los fenicoles pero los macrólidos son incapaces de atravesar la membrana mitocondrial y por lo tanto no producen supresión de la medula ósea de los mamíferos (Abu-Gharbien *et al.*, 2004; Giguere, 2006; USP, 2007).

Además de su eficacia terapéutica como agentes antimicrobianos, se ha informado que los macrólidos ejercen importante actividad antiinflamatoria y de inmunomodulación (Zalewska-Kaszubska, 2001; Tamaoki *et al.*, 2004; Buret, 2010; Munic *et al.*, 2011) véase cuadro 4. Munic *et al.* (2011) encontraron que en la línea celular J774A.1 de monocitos y macrófagos murinos los macrólidos inhiben la interleucina-6 (IL-6) y la prostaglandina E2 (PGE2) producidos con la estimulación de lipopolisacárido bacteriano (LPS). En la misma línea celular azitromicina afecta la movilización de la membrana y la endocitosis y al igual que otros antibióticos macrólidos se une a los lípidos. La tilmicosina se concentra dentro de macrófagos y polimorfonucleares, lo que resulta favorable para el tratamiento de infecciones producidas por patógenos intracelulares (Anadón y Reeve-Johnson, 1999).

Todos los fármacos de esta familia producen un efecto post antibiótico (EPA) prolongado (Naccari *et al.*, 2001). Tilmicosina y tilosina presentan un EPA por 8 horas cuando se logran concentraciones 8 veces más la CMI (Mestorino y Errecalde, 2004).

Es importante destacar que aunque se ha investigado el EPA desde mediados de 1970 y se ha demostrado su existencia en la mayoría de los antibióticos. Los mecanismos exactos de este efecto no se conoce. En el caso de los inhibidores de la síntesis de proteínas como los macrólidos y aminoglucósidos se especula que puede ser debido a la unión de cantidades sub-letales de fármaco al ribosoma. Diarra *et al.* (1999) postulan que el EPA podría interpretarse también como el tiempo necesario para reiniciar la síntesis de las proteínas ribosomales.

La resistencia puede ocurrir por la modificación del sitio blanco, la inactivación del fármaco o eflujo del mismo. Los organismos que desarrollan resistencia a un antibiótico macrólido también pueden ser resistentes a otros antibióticos macrólidos (USP, 2007). Según Anadón y Reeve-Johnson, (1999), el mecanismo más frecuente de la resistencia consiste en la modificación post-transcripcional del ARN ribosomal 23S de mono o di metilación de un residuo de adenina. Este mecanismo lleva la co-resistencia a los macrólidos, a las lincosamidas y estreptograminas tipo B. La resistencia a la eritromicina en aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* se asocia generalmente a una alteración química de la estructura del ribosoma, que codifica co-resistencia a los macrólidos, lincosamidas y estreptogaminas tipo B (resistencia MLSB). Algunos macrólidos sirven para estimular los genes inducibles de resistencia (*erm* para eritromicina), mientras que otros macrólidos, no. Por ejemplo, los macrólidos de 14 átomos, como la eritromicina estimula la expresión de los genes inducibles MLSB, mientras que los macrólidos de 16 átomos, como tilosina y tilmicosina no lo hacen (Coetzee, 2007), lo que explica, al menos en parte, su persistente eficacia clínica en campo.

Las propiedades farmacocinéticas de la tilmicosina son similares a las de los macrólidos en general. Se caracteriza por sus bajas concentraciones séricas pero un gran volumen de distribución, con acumulación y persistencia en muchos tejidos incluyendo el pulmón y

fluidos respiratorios. La tilmicosina se puede concentrar en el tejido respiratorio hasta 60 veces más que en suero. Adicionalmente la tilmicosina se acumula sustancialmente en macrófagos de los animales (Womble *et al.*, 2006), con efecto inmunoestimulante y con la capacidad de liberarlo cuando las concentraciones bajen en el medio en el que se encuentran. Lombardi *et al.*, (2011) han descrito su farmacocinética en bovinos después de la administración IV y SC de un preparado diseñado para larga acción. Los datos relevantes se presentan en cuadro 5.

La vía oral se ha utilizado en aves, cerdos, equinos y bovinos, pero no se ha detallado la biodisponibilidad oral de la tilmicosina (Clark, 2008). A diferencia de la vía oral, la vía SC ha sido ampliamente estudiada en bovinos, ovinos y caprinos (Radaman, 1997, Naccari *et al.*, 2003; Lombardi *et al.*, 2011). La absorción SC es bovinos adultos es más lenta que en terneros (FAO-OMS, 1998).

La vía IV fue utilizada por Radaman, (1997) y Lombardi *et al.*, (2011) para determinar su farmacocinética en cabras y bovinos respectivamente, pero no se utiliza debido a su toxicidad. La administración IM en equinos resulta en severa inflamación, edema y necrosis en el sitio de aplicación (Clark, 2007), en cerdos la administración parenteral de tilmicosina resulta fatal (Giguere, 2006). En cabras Radaman, (1997) no reporta efectos secundarios después de la administración SC.

Los macrólidos pasan fácilmente hacia los tejidos (con un pH inferior a la sangre) por difusión pasiva no iónica (Anadón y Reeve-Johnson, 1999). En bovinos después de su aplicación SC a una dosis de 10 mg/kg se alcanza el pico de la concentración sérica C_{max} = 0.55 a 0.714 $\mu\text{g/mL}$, en un T_{max} = 0.5 a 4.28 h, y una $T_{1/2\beta}$ = 29.4-30.83 h (Modric *et al.*, 1998; Lombardi *et al.*, 2011). La tilmicosina tiene un gran volumen de distribución (> 2 L/Kg), con acumulación y persistencia en tejidos respiratorios y glándula mamaria.

Es metabolizada en el hígado. No sufre grandes modificaciones metabólicas y sólo se reconocen dos derivados T1 (N-desmetil-tilmicosina) y T2 (dos anillos macrólidos y uno de piperidina) (Donoho, 1988). Del total de la dosis administrada por la vía SC en los bovinos,

un 24-30% se recupera en orina y el 68-70% en materia fecal (FAO-OMS, 1998). Sólo un 20% se elimina por orina en forma activa (Moredo *et al.*, 2001).

La dosis terapéutica de la tilmicosina es de 10 mg/kg para rumiantes. Clark *et al.*, (2007) encontró que la administración oral de tilmicosina, usada en cerdos con una dosis de 400 ppm en el alimento (equivalente a una dosis de 20 mg/kg de tilmicosina asumiendo un consumo de peso del 5%), dio lugar a altas concentraciones de residuos de tilmicosina en riñón 4.3 µg/g e hígado 4.5 µg/g. Fodor *et al.*, (2000) encontraron que la tilmicosina es eficaz administrada por vía oral a los terneros con una dosis de 12.5 mg/kg o 25 mg/kg para el tratamiento de la neumonía bacteriana. En equinos una dosis de 4 mg/kg SID por vía oral no produjo concentraciones plasmáticas detectables de tilmicosina (Clark *et al.*, 2007).

Se sabe que este macrólido induce taquicardia y dilatación cardíaca que puede llegar a ser fatal en otras especies que no sean los bovinos y en menor medida en otros rumiantes. Además, se ha informado de la inducción de nefrosis (EMA, 2010). El ser humano y los cerdos son particularmente sensibles a los efectos cardiotóxicos de la tilmicosina parenteral con fatalidades ocasionales por la inyección de dosis tan pequeñas como 0.5 mL del preparado comercial (aproximadamente 150 mg/dosis) aunque en otros casos no complicados se pueden tolerar dosis mayores (Oakes y Seifert, 2008). Los cambios que se manifiestan incluyen taquicardia, elevación de la creatinofosfoquinasa cardíaca, presencia de onda T invertida y retardo en la conducción ventricular por aumento de la deflexión intrínsecoide. Hay aumento del estrés oxidativo manifestado por alteraciones de las concentraciones plasmáticas de malondialdehído y glutatión (Von Essen *et al.*, 2003; Yazar *et al.*, 2004). Los bovinos solo presentan este efecto cuando se sobrepasa los 30 mg/kg y aunque pueden tolerar 50 mg/kg, en muchos individuos se desarrolla taquicardia, disminución del ionotropismo y gasto cardiacos, aparentemente por bloqueo de canales de Ca²⁺. Además puede haber daño renal en nefrosis (Jordan *et al.*, 1993; Mestorino y Errecalde, 2004). Sin embargo, no se sabe que toxicidad puede inducir concentraciones consideradas terapéuticas máximas de aproximadamente 1.0 µg/mL, posterior a

inyecciones repetidas que brinden un manifestado valor doble, triple o cuádruple en biodisponibilidad absoluta, expresada en términos de área bajo la curva (AUC) de la concentración vs tiempo.

De acuerdo con la literatura, la administración de una dosis de 10 mg/kg brinda valores de AUC que fluctúan entre 14 y 21 $\mu\text{g/mL/hora}$ (Ziv *et al*, 1995; Modric *et al*, 1998). Esto presupone una carga toxicológica determinada para corazón y riñones. Pero en virtud de que es poco común que se administre tilmicosina 2 o 3 o incluso más veces a los becerros por el manejo y una argumentada relación costo-beneficio (Sargeant *et al*, 1994; Van der Fels-Klerx *et al*, 2000), no se conoce el efecto sobre el corazón que pueden generar cargas sucesivas de tilmicosina, aunque no se eleve la concentración plasmática más allá de 1.5 $\mu\text{g/mL}$, como lo indican sus estudios cinéticos. Se reconoce en animales de laboratorio que hay una estrecha correlación entre una elevación de la creatinino-cinasa cardíaca y la creatinino-cinasa MB y la toxicidad inducida por tilmicosina (Asim-Kart y Karapehlivan, 2006). Sin embargo, esto no se ha caracterizado para bovinos. De cualquier forma la comunidad internacional está buscando nuevas presentaciones farmacéuticas de tilmicosina que duren más en las variables de vida media de absorción ($T_{1/2ab}$) y de eliminación ($T_{1/2\beta}$) (por un fenómeno denominado farmacocinética *flip-flop*) para extender el efecto de este antibacteriano y disminuir su toxicidad local y cardíaca; tal es el caso del preparado experimental incluido en liposomas estables que redujo notablemente las toxicidades dichas (Han *et al*, 2009).

1.3. Sistemas de liberación de fármacos

Se han diseñado formas de dosificación y sistemas liberación modificada (SLM) para administrar medicamentos que logren mantener niveles terapéuticos durante un mayor tiempo en sangre. Hay varias ventajas para el uso de formas de dosificación de liberación controlada, como: una actividad prolongada, menos dosis, menos efectos secundarios, la toxicidad reducida, y un mejor cumplimiento del tratamiento por parte del paciente, entre otros (Ranade y Hollinger, 2004).

En principio hay tres formas de acercarse a la liberación prolongada por medio de la administración parenteral, por métodos farmacológicos, químicos y físicos. Los métodos farmacológicos incluyen; la administración intramuscular o subcutánea en lugar intravenosa, la administración simultánea de vasoconstrictores (ej., adrenalina en anestésicos locales, efedrina en soluciones de heparina) y la inhibición de la eliminación de los fármacos a través de los riñones al administrar simultáneamente un agente de bloqueo, como probenecid con penicilina o el ácido p-aminosalicílico, logrando así elevar la concentración en el plasma sanguíneo y prolongando la acción farmacológica. Los métodos químicos incluyen el uso de sales, ésteres y complejos del ingrediente activo de baja solubilidad. Los métodos físicos se refieren a la selección correcta del vehículo que proporcione una liberación prolongada (al usar soluciones oleosas en lugar de soluciones acuosas); adicionando moléculas que incrementen la viscosidad (carboximetilcelulosa, NaCMC, polivinilpirrolidona, tragacanto etc.,) el uso de materiales de hinchamiento para aumentar la viscosidad en soluciones oleosas (monoestearato de aluminio); la adición de adsorbentes el uso de soluciones bajo las cuales el fármaco precipite al entrar en contacto con los fluidos corporales, el uso de suspensiones oleosas y acuosas y el uso de implantes (Ranade y Hollinger, 2004) entre muchas otras posibilidades.

La fórmula básica para lograr liberación controlada de un fármaco es a través del uso de matrices², entre las que destacan los polímeros solos o con una combinación de ellos y con otros excipientes, dispuestos de modo que permiten que el fármaco se libere durante un período prolongado a una velocidad controlada. También se han investigado las mezclas de polímeros para producir formas de dosificación de liberación controlada (Han *et al*, 2008; González y Ghaly, 2010).

² Las matrices poliméricas son dispersiones moleculares o partículas de fármaco distribuidas uniformemente en el seno de un polímero, se clasifican en de acuerdo al polímero de soporte en hidrofílicas, lipofílicas e inertes (Bernad *et al*, 2003).

Con la mayoría de los vehículos convencionales, la administración de un fármaco, genera un valor máximo y después cae para dar un nivel mínimo. Esto hace necesaria la aplicación de una nueva dosis. Además, si el máximo o el mínimo de concentración del fármaco en el medio se sitúan por encima del nivel de toxicidad o por debajo del nivel mínimo efectivo, se pueden producir de forma alternante períodos de toxicidad y de ineficacia. Esta situación es particularmente problemática si ambos niveles (toxicidad y efectividad) están muy próximos. Para fármacos con este comportamiento resulta útil pensar en los sistemas matriciales de liberación prolongada. En particular, los sistemas poliméricos presentan la ventaja de que, dado un diseño adecuado son capaces de mantener la concentración de fármaco entre esos dos niveles a partir de una dosis única, liberando el fármaco de forma más o menos continua en un tiempo más prolongado que con sistemas convencionales. Se teoriza que, ya dentro de una matriz polimérica, para que la sustancia que se va a liberar alcance el lugar de liberación deseado dentro del organismo de un animal, se tiene que producir primeramente la difusión del mínimo activo a la superficie de su transportador y entrar en contacto con el medio que lo rodea para difundir y absorberse. Saéz *et al*, (2004) mencionan cuatro mecanismos generales mediante los cuales es posible clasificar los sistemas de liberación controlada: 1) sistemas controlados por difusión, 2) sistemas controlados químicamente, 3) sistemas activados por un disolvente y 4) sistemas controlados magnéticamente. En los nombres queda implícita su forma de generar liberación controlada. Se han utilizado diversos vehículos para mantener una liberación lenta o sostenida de los fármacos como se ejemplifica en el cuadro 6.

La terminología usada para describir los SLM es la propuesta por Bernad *et al*, (2003) 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 se le denomina liberación modificada. De esta forma de liberación se distinguen tres tipos:

a) *La liberación acelerada*. Que es aquella preparación farmacéutica cuya velocidad de liberación del activo es mucho más rápida que la de una forma de liberación convencional

destinada a la misma vía. Un ejemplo de estos sistemas son los comprimidos de rápida disolución en los cuales la absorción comienza desde la cavidad bucal donde la forma farmacéutica ya se encuentra disgregada y disuelta en los fluidos salivales.

b) *La liberación diferida o retardada*. Definida como la preparación farmacéutica cuya velocidad de liberación del activo es retardada en el organismo gracias a un modo de fabricación, esto es, la preparación libera el principio activo en un momento diferente a inmediatamente después de su administración. Se debe de diferenciar de los otros sistemas en que aunque hay un “control” en cuanto a la forma y el tiempo de liberación. Esta no puede ser constante por extensos periodos de tiempo. De hecho lo que permiten es retardar la entrega del principio activo hasta que el sistema alcanza un cierto punto en el tracto gastrointestinal. Por ejemplo, las formulaciones de liberación retardada desarrolladas con recubrimientos de película para prevenir la liberación en el estómago y que su activo sea liberado una vez que alcanza el colón.

c) *Liberación prolongada ó extendida*. Que es la preparación farmacéutica que permite una reducción de al menos dos veces la frecuencia de administración en comparación con una forma convencional. Lo que se traduce en que si un paciente requería tomar medicamento oral cada cuatro horas, con un sistema de liberación prolongada probablemente requerirá de sólo una dosis por la mañana y otra por la noche para tener niveles terapéuticos. No obstante aunque el efecto de una dosis ha sido extendido, no existe un control real de la liberación. Ejemplos de estos sistemas son aquellos que disminuyen la velocidad de entrega del principio activo modificando la velocidad de disolución. Otro caso son los comprimidos de *acción repetida* en los cuales varias dosis del activo son contenidas dentro de una misma forma de dosificación la cual liberará cada dosis a un intervalo periódico.

El término *liberación controlada* (SLC) tiene varias definiciones afines tales como *sistemas inteligentes, dirigidos, novedosos, programados*, etc. De hecho todos coinciden en un aspecto, que el sistema es capaz de proveer control en la concentración del activo ó de ubicación en el organismo ó ambos. En otras palabras, el sistema intenta controlar la

liberación del activo en forma planeada y predecible en el tejido blanco. Los SLC tratan de mantener niveles plasmáticos semejantes a los logrados con una infusión intravenosa continua.

Las ventajas teóricas de estas nuevas formas farmacéuticas según el tipo son:

- Disminución de la frecuencia de administración por aumento del intervalo posológico.
- Menor incidencia de reacciones adversas por la reducción de las fluctuaciones en las concentraciones plasmáticas.
- Facilidad en la administración de algunos sistemas de liberación modificada.

Los sistemas de liberación modificada también tienen algunos inconvenientes:

- Sobredosificación por manipulación incorrecta del medicamento.
- Agravamiento o peor control de situaciones de sobredosis, de aparición de reacciones adversas o alergias.
- Interacciones farmacéuticas y farmacocinéticas.
- Mayor precio.
- Mayor complejidad en el proceso de manufactura.

Los SLM intentan desarrollar un esquema de entrega de fármacos al organismo que produzcan un nivel terapéutico efectivo de la manera más rápida posible y que luego esta concentración se mantenga durante un tiempo prolongado de manera reproducible. Para la elaboración de estos sistemas es necesario contar con materias primas adecuadas que garanticen esta función. En la mayoría de los SLM, el fármaco, se introduce en el interior de lo que se denomina matriz o reservorios, siendo éste normalmente un material polimérico (García, 2011).

A continuación se hace una descripción de algunos de los vehículos usados en los SLM.

1.3.1. Características de los excipientes

1.3.2. Poloxámeros

Los poloxámeros son copolímeros tribloque no iónicos de poli(oxietileno)-poli(oxipropileno), usados en formulaciones farmacéuticas como agentes (surfactantes, emulsionantes, solubilizantes, dispersantes) y potenciadores de la absorción *in vivo*. Los poloxámeros son a menudo considerados como "excipientes funcionales" porque son componentes esenciales, que desempeñan un papel clave en la formulación (Subhashni *et al.*, 2008; Karekar *et al.*, 2009; Patel *et al.*, 2009; Ji-Lai *et al.*, 2010).

Todos los poloxámeros tienen estructuras químicas similares, pero con diferentes pesos moleculares, diferente proporción del bloque hidrofílico EO (a) e hidrofóbico bloque PO (b). Dos de los poloxámeros más comúnmente utilizados son: poloxámero 188 (a = 80, b = 27) con un peso molecular que va desde 7680 hasta 9510 Da y poloxámero 407 (a = 101, B = 56) con un peso molecular que va desde 9840 hasta 14600 Da. (Subhashni *et al.*, 2008; Patel *et al.*, 2009). Véase figura 4. Además de tener la capacidad de funcionar como vehículo matricial para preparados farmacéuticos, otros efectos de los poloxámeros son por ejemplo la protección por efecto del surfactante contra el estrés oxidativo, la inflamación y en la prevención de la necrosis aguda de las células del músculo esquelético de ratas adultas después de altas dosis de exposición a la radiación ionizante. El poloxámero 188 (P-188), reduce la pérdida de tejidos y la infiltración de macrófagos después de una lesión cerebral excitotóxica en la rata. Los posibles mecanismos de este efecto puede incluir la modulación directa de surfactante sobre la fluidez de la membrana celular durante la inflamación (Moghimi y Hunter, 2000; Patel *et al.*, 2009).

Mullen *et al.*, (1997), encontraron una formulación micelar de la anfotericina B (AmB) solubilizada con P-188 que fue evaluada frente a una línea de AmB *Leishmania donovani* resistente. El resultado fue el aumento de la actividad de la AmB contra los amastigotes ("wild type"). Se postula que el P-188 no modifica la actividad del fármaco libre a nivel de membrana, su efecto podría ser una consecuencia del efecto del surfactante en la

agregación de la AmB. Además, este efecto puede mejorar la absorción del fármaco por los macrófagos y modular su acción.

Se sabe poco de su farmacocinética, pero una vez absorbido del sitio de inyección, el P-188 es transportado en el plasma, aproximadamente el 26% unido a proteínas plasmáticas (albúmina) y el 74% distribuido en forma libre. La principal vía de excreción del P-188 es la renal (Subhashni *et al.*, 2008). Sin generar daño aparentemente.

1.3.3. Propilenglicol: 1,2-propilenglicol (PG)

Su fórmula molecular es $C_3H_8O_2$, con un peso molecular de 76.09 (NTP-CERHR, 2004; Sigma-Aldrich, 2008), véase la Figura 5. Es un líquido incoloro, inodoro, soluble en agua se considera seguro para su uso en formulaciones comerciales de alimentos, medicamentos y cosméticos. Ha sido aprobado como colorante de alimentos, condimentos, medicamentos, cosméticos y como aditivo directo a los alimentos. Se utiliza como humectante en el tabaco, en alimentos para mascotas, en los dentífricos, y en la medicina veterinaria se utiliza como glucogénico en los rumiantes (NTP-CERHR, 2004; Rowe, *et al* 2009).

En medicina veterinaria, Nielsen e Ingvarstsen, (2004) reportaron el uso oral del PG en bovinos para el tratamiento de cetosis e hígado graso, además tiende a aumentar la producción de leche y reducir el porcentaje de grasa. El PG también puede tener algunos efectos secundarios que incluyen ataxia, salivación, hiperventilación y la depresión, especialmente a altas dosis.

En la mayoría de los mamíferos, el PG absorbido es eliminado sin cambios por el riñón, mientras que la otra parte es excretada por los riñones como un conjugado de ácido glucurónico. La cantidad de PG eliminada por los riñones se ha estimado para los perros de 55-88%, de la dosis y de 24 a 14,2% en conejos. Los gatos no tienen la capacidad de producir el metabolito glucurónico. El PG, tiene una toxicidad sistémica muy baja en animales de experimentación. Se metaboliza principalmente en ácido láctico y ácido

pirúvico, los cuales son componentes normales del ciclo del ácido cítrico (NTP-CERHR, 2004). Véase figura 6 y 7

1.3.4 Pirrolidona

Su fórmula molecular es C_4H_7NO , con un peso molecular de 85.11. Es un líquido incoloro o ligeramente gris, en forma de cristales blancos o casi blancos, o incoloros. Tiene un olor característico. La pirrolidona parece ser un eficaz potenciador de penetración, ha demostrado que es mejor solubilizante que la glicerina, el propilenglicol o el etanol, también ha sido investigada para su aplicación en formulaciones de depósito de liberación controlada. Además ha mostrado que posee actividad antimicrobiana contra bacterias gram positivas, gram negativas y hongos, se utiliza principalmente como disolvente en los fármacos de uso veterinario. En 1998 la FDA estableció una ingesta diaria admisible de 1,2 $\mu\text{g}/\text{día}$, para 2-pirrolidona como parte de una formulación parenteral de Oxitetraciclina. En los mamíferos, la pirrolidona se biotransforma en metabolitos polares que se excretan por la orina, es ligeramente tóxica por ingestión oral y por vía subcutánea. (Rowe, *et al* 2009). Su estructura se presenta en la figura 8.

2. Planteamiento del problema

Se planteó como proyecto diseñar una tilmicosina de larga acción extendida³ que logre concentraciones plasmáticas por más tiempo lo que mejoraría su relación de farmacocinética/farmacodinamia.

Se eligió la tilmicosina dado que es uno de los fármacos de primera elección para el tratamiento del complejo respiratorio bovino. Tiene una distribución elevada, incluso penetra a nivel intracelular y presenta menos resistencia bacteriana, en comparación con macrólidos de 14 átomos. Tiene propiedades antiinflamatorias y de inmunomodulación. Es útil contra una amplia gama de patógenos como: (*Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*, *Mycoplasma spp*)

Se busca una concentración óptima, a lo largo de una sola dosis, o bien durante el intervalo de tratamiento, teniendo en cuenta que los macrólidos tienen excelente distribución a tejidos pulmonares y son fármacos considerados tiempo-dependientes desde el punto de vista clínico. Con base en lo encontrado en la literatura se postulan como metas concentraciones plasmáticas que fluctúen entre 0.1 y 2 µg/ml. Es particularmente importante para la tilmicosina no sobrepasar concentraciones de 4 µg/ml pues se sabe que la tilmicosina induce cardiotoxicidad con taquicardia. Al lograr dichas concentraciones se evitan concentraciones cardiotoxicas en el plasma, aún aumentando la dosis a niveles tóxicos (30mg/kg).

Con estos antecedentes se planteó diseñar una formulación parenteral de liberación sostenida de tilmicosina que debe estar acotada entre los límites antes mencionados a fin de evitar sus efectos cardiotóxicos. Un preparado de larga acción tendría ventajas terapéuticas importantes ya que se reconoce que un medicamento tiempo-dependiente y en particular para el manejo de los bovinos productores de carne, representa ventajas obvias como: disminución del estrés por manejo en una segunda inyección, ahorros en personal, equipo y sobretodo se postula una mayor eficacia clínica.

³ Que es la preparación farmacéutica que permite una reducción de al menos dos veces la frecuencia de administración en comparación con una forma convencional.

3. Justificación

Con el uso de un preparado inyectable de tilmicosina de acción extendida, es posible tratar a cada animal afectado de una manera más eficiente. Los bovinos podrán recibir una dosis más elevada a la establecida pero con un perfil PK/PD, más adecuado de este antibiótico tiempo-dependiente. Con ello, es factible que más animales requieran una sola dosis y de esta manera se reduce el manejo y el estrés ocasionado por dosis adicionales.

Al cubrir por más tiempo las concentraciones terapéuticas es de esperar que se mejore la respuesta clínica en enfermedades respiratorias y quizá en otros casos como en el secado parenteral en vacas productoras de leche.

Se eligió la tilmicosina por sus características de inmunomodulación y sus propiedades antiinflamatorias, sumadas a su actividad antimicrobiana, que resultan en un fármaco con múltiple actividad para abatir el complejo respiratorio bovino (CRB) y quizá otras entidades infecciosas.

Las concentraciones plasmáticas no deben ser cardiotóxicas pero deben permanecer a nivel terapéutico por más tiempo, usando dosis consideradas como potencialmente cardiotóxicas de 20-30 mg/kg.

4. Hipótesis

Mediante la inclusión de tilmicosina en matrices poliméricas es posible generar un preparado farmacéutico de larga acción extendida, superior en ese rubro al valor de la tilmicosina de liberación prolongada existente comercialmente (referente), sin llegar a una dosis cardiotoxica y con ello lograr una especialidad farmacéutica de tilmicosina más congruente con su relación farmacocinética/farmacodinámica (PK/PD) dado que este antibacteriano es considerado un principio activo tiempo-dependiente.

5. Objetivos

Elaborar varios preparados con la máxima concentración posible de fosfato de tilmicosina, utilizando como matrices poliméricas: poloxámero 188, poloxámero 407, n-metilpirrolidona, propilenglicol.

Evaluar los prototipos de la fase anterior en ratas anestesiadas para determinar tolerancia tisular a la administración SC y determinar en los casos más viables las concentraciones séricas por 5 días, finalmente eligiendo uno o varios prototipos.

Evaluar en los mejores prototipos de la fase anterior, la posible cardiotoxicidad o ausencia de ésta en ratas mediante electrocardiografía (derivada II).

Elegir de las fases anteriores al menos 2 prototipos para evaluar su farmacocinética, cardiotoxicidad y tolerancia local en bovinos y comparar los datos con la farmacocinética del preparado comercial (de referencia)

Elegir el mejor prototipo en función de sus variables PK/PD y de las posibles reacciones adversas.

6. Material y métodos

La fase analítica se realizó en el laboratorio del departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Nacional Autónoma de México, (FMVZ, UNAM) ubicada en Ciudad Universitaria. 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 y fue llevado a cabo en granjas experimentales de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FES-C), ubicada en el Km 2.5 Carretera Cuautitlán–Teoloyucan, San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, Estado de México y en las instalaciones del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Agro-Silvo Pastoral (CEIEPASP) de la FMVZ UNAM. Este centro se localiza en el Km 68 de la carretera Atizapán-Jilotepec, Chapa de Mota, Edo. de México. Las ratas Wistar incluidas en el estudio fueron obtenidas del bioterio del Instituto de Fisiología Celular, también de la UNAM. Para el diseño y evaluación farmacocinética y cardiotoxicológica de un preparado de tilmicosina de larga acción extendida en bovinos, se siguió el siguiente diagrama de flujo (figura 9).

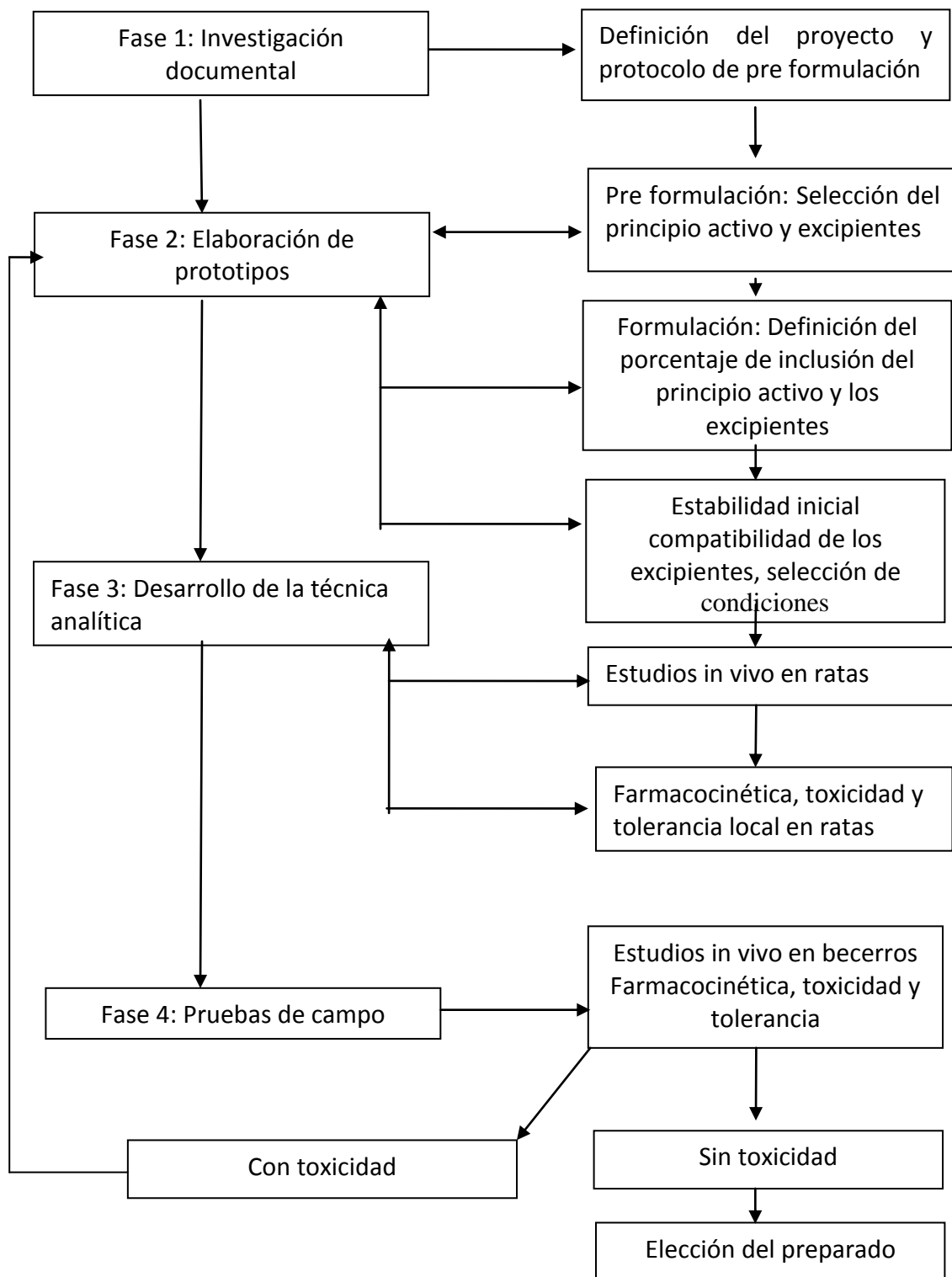


Figura 9. Diagrama de flujo presentando el desarrollo de la investigación

6.1 Fase 1: Investigación documental

La revisión bibliográfica del principio activo y de los excipientes a utilizar, hizo posible generar diversos prototipos y eventualmente obtener un medicamento estable, con una absorción similar a una cinética de orden cero, sin toxicidad cardiaca aparente y que puede escalarse para ser fabricado a nivel proceso industrial sin inversión de equipo especial o costoso.

Datos de los excipientes

Propilenglicol

Sinónimos: 1,2-dihidroxipropano, 2-hidroxipropanol, metil etilen glicol, metil glico, propano 1,2 diol.

Categoría Funcional: conservante antimicrobiano, desinfectante, humectante, plastificante, solvente, estabilizante para vitaminas, cosolvente miscible en agua.

Uso	Forma de dosificación	Concentración recomendada (%) Rowe <i>et al</i> , (2009)
Humectante	Tópica	15
Preservativo	Soluciones y semisólidos	15-30
Solvente o	Parenteral	10-60
Cosolvente	Tópica	5– 80
	Solución en Aerosol	10-30

Vía	Concentración en medicamentos aprobados por la FDA, (2009)			
IM	40-82%			
IV	30-82%			
Transdermal	25 %			
Oral solución	10-92%			
Seguridad	Vía	Dosis	Tiempo tratamiento	Toxicidad
Ratas	Oral	30 ml/ kg en la dieta	6 meses	No se observó
Perros	Oral	2 g/kg	2 años	No se observó
Especie	Vía	Toxicidad aguda (LD50), Rowe <i>et al</i> , (2009)		
Ratón	IP	9.72 g/kg		
Ratón	IV	6.63 g/kg		

Ratón	Oral	22.0 g/kg
Ratón	SC	17.34 g/kg
Rata	IM	0.01 g/kg
Rata	IP	6.66 g/kg
Rata	IV	6.42 g/kg
Rata	Oral	0.02 g/kg
Rata	SC	22.5 g/kg

Poloxamero

Sinonimos: lutrol, monolan, pluronic, poloxalkol, copolímero polietilen-propilen glycol, copolímero polioxietilen-polioxipropilen, supronic, synperonic.

Categoría Funcional: Dispersante, agente emulsificante, agente humectante, lubricante.

Uso	Concentración recomendada(%)
Agente gelante	15-50
Agente estabilizante	1-5
Agente Humectante	0.01 – 5

Vía	Concentración en medicamentos aprobados por la FDA, (2009)			
Oftálmico 407	0.16-0.2%			
Oral 407	5 – 12.6%			
Tópico 407	1 – 15.5 %			
IV 188	0.6-0.22%			
Oftálmico 188	0.1%			
Seguridad	Vía	Dosis	Tiempo del tratamiento	Toxicidad
Conejos y perros	IV	0.5 g/kg/día	14 días	No se observó
Ratas	Oral	3 – 5 % alimento	2 años	No se observó
Ratas	Oral	7.5 %		Disminuyo el porcentaje de crecimiento

Especie	Vía	Toxicidad aguda (LD50) Rowe <i>et al</i> , (2006)
Ratón	IV	1 g/ kg
Ratón	SC	5.5 g/kg
Rata	IV	7.5 g/kg

N-metilpirrolidona

Sinónimos: ácido lactámico gamma amino butírico, ácido 4-gammaaminobutírico, γ -aminobutirolactámico, γ -butirolactámico, butirolactámico, 2-oxopirrolidina, 2-pirrol, α -pirrolidona, pirrolidona, α -pirrolidona, Soluphor P.
 Categoría Funcional: potenciador de la penetración, plastificante, disolvente, agente de solubilización.

Uso		Concentración recomendada (%)		
Solvente agente de solubilización depósito en formulaciones de liberación controlada		25.85		
Vía	Concentración en medicamentos aprobados por la FDA, (2009)			
IM IV SC	40mg/kg			
Seguridad	Vía	Dosis	Tiempo del tratamiento	Toxicidad
Ratas	Oral	40 mg/kg	90 días	No se observo
Perros	Oral	79 mg /kg	90 días	No se observo
Conejos	Oral	55 mg /kg	30 días	No se observo

Especie	Vía	Toxicidad aguda (LD50) Rowe <i>et al</i> , (2006)
Ratón	IP	3.05 g/kg
Ratón	IV	0.155 g/kg
Ratón	Oral	5.13 g/kg
Conejo	SC	8.0 g/kg
Rata	IP	2.472 g/kg
Rata	IV	0.0805 g/kg
Rata	Oral	3.914 g/kg

Etanol

Sinónimos: alcohol etílico, hidróxido de etilo, carbinol metílico.
Categoría Funcional: preservativo antimicrobial, desinfectante, solvente.

Uso	Concentración (%)
Preservativo antimicrobial	10
Solvente en solución inyectable	Variable
Solvente en productos tópicos	60-90

Vía	Concentración en medicamentos aprobados por la FDA, (2009)
IM	6.1-12%
IV	0.94 - 49%
SC	0.945 - 6.1- %

Especie	Vía	Toxicidad aguda (LD50) Rowe <i>et al</i> , (2006)
Ratón	IV	1.97 g/ kg
Ratón	SC	8.29 g/kg
Rata	IV	1.44 g/kg

Nota: La cantidad propuesta de los excipientes en el preparado Tilmicosina-LAE está dentro de las especificaciones de bioseguridad investigadas.

6.2 Definición del proyecto y protocolo de pre formulación.

Se definió el medicamento a desarrollar, se establecieron los objetivos que permitieran concentrarse en el perfil del producto y poder de esta manera plantear una estrategia de trabajo viable.

Nombre del proyecto: Tilmicosina de larga acción extendida en bovinos (Tilmicosina-LAE)

Principio Activo: Tilmicosina fosfato

Dosis: 30 mg/kg

Forma Farmacéutica: Inyectable

Vía de Administración: Subcutánea

Tipo de liberación: Liberación modificada

Indicación Terapéutica: Antibiótico de amplio espectro para ganado bovino (Complejo respiratorio bovino)

Nota: El principio activo fue proporcionado por Casal's, SA de CV, y comprada originalmente a Shandong Jiulong Fine Chemical Co. Ltd con un 97% de pureza.

Protocolo de pre formulación

a) Equipo de manufactura

Material	Cantidad
Barra magnética	1
Balanza analítica	1
Papel parafilm	1
Pipetas graduadas de 10 mL	2
Platina de agitación magnética	1
Refrigerador	1
Vaso de precipitados de 100 mL	1
Vaso de precipitados de 250 mL	1

b) Equipo de seguridad

Material	Cantidad
Campana de extracción de gases	1
Bata de manga larga	1
Cubre bocas contra humos y nieblas	1
Escafandra de área estéril	1
Goggles	1
Guantes de nitrilo	1

c) Condiciones de manufactura

1. Antes de iniciar la preparación, verifique que el equipo de manufactura esté limpio.
2. Avise al inspector de calidad para que corrobore la limpieza, orden del local y del equipo de manufactura, firmando la orden de producción si está conforme.
3. No inicie la preparación antes de tener listo el equipo y materiales de subdivisión debidamente limpios y en condiciones de uso.

d) Precauciones

1. Se usará para la preparación exclusivamente recipientes de vidrio o acero inoxidable.
2. No añadir ningún nuevo componente, si no se han cumplido con lo indicado en la técnica de manufactura.
3. No iniciar la preparación si no ha sido autorizado por control de calidad el local, equipo y accesorios de manufactura.
4. Usar en la preparación la campana de extracción de gases.
5. Seguir al pie de la letra las instrucciones de manufactura.
6. Si en el curso de la preparación se presenta alguna anomalía (cambio de color, separación, etc.), avisar de inmediato al responsable del desarrollo.
7. En todo momento proteger la preparación de la acción de la luz.

e) Estudios especiales proyectados:

En animales de laboratorio y en ganado bovino.

6.3 Fase 2: Pruebas de laboratorio: pre formulación

Técnica de manufactura tilmicosina-LAE

Se elaboraron diferentes preparados de tilmicosina con las combinaciones de los vehículos elegidos a diferentes concentraciones.

Elaboración de 100 mL de Tilmicosina L.A. al 30 %

Fórmula: Til-Exp-A

Tilmicosina fosfato	42 g
Alcohol etílico	10 mL
Poloxámero 188	6 g
Propilenglicol	10 mL
Agua destilada cbp	100 mL

Procedimiento

1. En un vaso de precipitados con capacidad para 250 ml, limpio y seco. Transferir 32 mL de agua destilada, medidos con una probeta de 100 mL

2. Añadir 10 mL de propilenglicol. Agitar hasta homogenizar.
3. Adicionar 10 mL de alcohol etílico, tapan el vaso con papel parafilm, mezclar hasta homogenizar.
4. Incorporar 42 g de tilmicosina fosfato (equivalente a 30g de tilmicosina base), la incorporación se realiza muy lentamente evitando la formación de grumos. Mezclar hasta homogenizar.
5. Agregar 6 g de poloxámero 188, agregar lentamente para que se vaya homogenizando la mezcla. Refrigerar (4 °C) la solución, durante 1 hora, agitar por 5 min.
6. Refrigerar durante 24 horas; agitar hasta obtener la completa disolución del poloxámero.
7. Solicitar el análisis del departamento de control de calidad, este muestreará para efectuar el estudio y aprobará o rechazará de acuerdo al resultado.

Elaboración de 100 mL de Tilmicosina L.A.E. al 30%

Fórmula: Til-Exp-B

Alcohol etílico	10 mL
Poloxámero 407	7 g
Propilenglicol	10 mL
Tilmicosina fosfato	42 g
N metilpirrolidona	0.1 mL
Agua destilada cbp	100 mL

Procedimiento

1. En un vaso de precipitados con capacidad para 250 ml, limpio y seco. Transferir 30.9 mL de agua destilada, medidos con una probeta de 100 mL.
2. Añadir 10 mL de propilenglicol. Agitar hasta homogenizar.
3. Adicionar 10 mL de alcohol etílico, tapan el vaso con papel parafilm, mezclar hasta homogenizar.

4. Incorporar 42 g de tilmicosina fosfato (equivalente a 30g de tilmicosina base), la incorporación se realiza muy lentamente evitando la formación de grumos. Agitar hasta homogenizar.
5. Agregar 0.1 mL de N-metilpirrolidona. Agitar hasta homogenizar.
6. Agregar 7 g de poloxámero 407, agregar lentamente para que se vaya homogenizando la mezcla. Refrigerar (4 °C) la solución, durante 1 hora, agitar por 5 min.
7. Refrigerar durante 24 horas; agitar hasta obtener la completa disolución del poloxámero.
8. Solicitar el análisis del departamento de control de calidad, este muestreará para efectuar el estudio y aprobará o rechazará de acuerdo al resultado.

Elaboración de 100 mL de Tilmicosina L.A. al 35%

Fórmula: Til-Exp-C

Alcohol etílico	10 mL
Poloxámero 188	6 g
Propilenglicol	10 mL
Tilmicosina fosfato	49 g
Agua destilada cbp	100 mL

Procedimiento

1. En un vaso de precipitados con capacidad para 250 ml, limpio y seco. Transferir 25 mL de agua destilada, medidos con una probeta de 100 mL.
2. Añadir 10 mL de propilenglicol. Agitar hasta homogenizar.
3. Adicionar 10 mL de alcohol etílico, tapan el vaso con papel parafilm, mezclar hasta homogenizar.
4. Incorporar 49 g de tilmicosina fosfato (equivalente a 35g de tilmicosina base), la incorporación se realiza muy lentamente evitando la formación de grumos. Agitar hasta homogenizar.

5. Agregar 6 g de poloxámero 188, agregar lentamente para que se vaya homogenizando la mezcla. Refrigerar (4 °C) la solución, durante 1 hora, agitar por 5 min.
6. Refrigerar durante 24 horas; agitar hasta obtener la completa disolución del poloxámero.
7. Solicitar el análisis del departamento de control de calidad, este muestreará para efectuar el estudio y aprobará o rechazará de acuerdo al resultado.

Elaboración de 100 mL de Tilmicosina L.A. al 35%

Fórmula: Til-Exp-D

Alcohol etílico	10 mL
Poloxámero 407	7 g
Propilenglicol	10 mL
Tilmicosina fosfato	49 g
Agua destilada cbp	100 mL

Procedimiento

1. En un vaso de precipitados con capacidad para 250 ml, limpio y seco. Transferir 24 mL de agua destilada, medidos con una probeta de 100 mL.
2. Añadir 10 mL de propilenglicol. Agitar hasta homogenizar.
3. Adicionar 10 mL de alcohol etílico, tapar el vaso con papel parafilm, mezclar hasta homogenizar.
4. Incorporar 49 g de tilmicosina fosfato (equivalente a 35 g de tilmicosina base), la incorporación se realiza muy lentamente evitando la formación de grumos. Agitar hasta homogenizar.
5. Agregar 7 g de poloxámero 407, agregar lentamente para que se vaya homogenizando la mezcla. Refrigerar (4 °C) la solución, durante 1 hora, agitar por 5 min.
6. Refrigerar durante 24 horas; agitar hasta obtener la completa disolución del poloxamero.

7. Solicitar el análisis del departamento de control de calidad, este muestreará para efectuar el estudio y aprobará o rechazará de acuerdo al resultado.

Elaboración de 100 mL de Tilmicosina L.A. al 35%

Fórmula: Til-Exp-E

Alcohol etílico	10 mL
Poloxámero 407	6 g
Propilenglicol	10 mL
Tilmicosina fosfato	49 g
N metilpirrolidona	0.2 mL
Agua destilada cbp	100 mL

Procedimiento

1. En un vaso de precipitados con capacidad para 250 ml, limpio y seco. Transferir 24.8 mL de agua destilada, medidos con una probeta de 100 mL.
2. Añadir 10 mL de propilenglicol. Agitar hasta homogenizar.
3. Adicionar 10 mL de alcohol etílico, tapan el vaso con papel parafilm, mezclar hasta homogenizar.
4. Incorporar 49 g de tilmicosina fosfato (equivalente a 35g de tilmicosina base), la incorporación se realiza muy lentamente evitando la formación de grumos. Agitar hasta homogenizar.
5. Agregar 0.2 mL de N-metilpirrolidona. Agitar hasta homogenizar.
6. Agregar 6 g de poloxámero 407, agregar lentamente para que se vaya homogenizando. Refrigerar (4 °C) la solución, durante 1 hora, agitar por 5 min.
7. Refrigerar durante 24 horas; agitar hasta obtener la completa disolución del poloxámero.
8. Solicitar el análisis del departamento de control de calidad, este muestreará para efectuar el estudio y aprobará o rechazará de acuerdo al resultado.

Elaboración de 100 mL de Tilmicosina L.A. al 40%

Fórmula: Til-Exp-F

Alcohol etílico	10 mL
Poloxámero 407	5 g
Propilenglicol	10 mL
Tilmicosina fosfato	56 g
N metilpirrolidona	0.1 mL
Agua destilada cbp	100 mL

Procedimiento

1. En un vaso de precipitados con capacidad para 250 ml, limpio y seco. Transferir 18.9 mL de agua destilada, medidos con una probeta de 100 mL.
2. Añadir 10 mL de propilenglicol. Agitar hasta homogenizar.
3. Adicionar 10 mL de alcohol etílico, tapan el vaso con papel parafilm, mezclar hasta homogenizar.
4. Incorporar 56 g de tilmicosina fosfato (equivalente a 40g de tilmicosina base), la incorporación se realiza muy lentamente evitando la formación de grumos. Agitar hasta homogenizar.
5. Agregar 0.1 mL de N-metilpirrolidona. Agitar hasta homogenizar.
6. Agregar 5 g de poloxámero 407, agregar lentamente para que se vaya homogenizando. Refrigerar (4 °C) la solución, durante 1 hora, agitar por 5 min.
7. Refrigerar durante 24 horas; agitar hasta obtener la completa disolución del poloxámero.
8. Solicitar el análisis del departamento de control de calidad, este muestreará para efectuar el estudio y aprobará o rechazará de acuerdo al resultado.

Elaboración de 100 mL de Tilmicosina L.A. al 40%

Fórmula: Til-Exp-G

Alcohol etílico	10 mL
Poloxámero 188	5 g
Propilenglicol	10 mL
Tilmicosina fosfato	56 g
Agua destilada cbp	100 mL

Procedimiento

1. En un vaso de precipitados con capacidad para 250 ml, limpio y seco. Transferir 19 mL de agua destilada, medidos con una probeta de 100 mL.
2. Añadir 10 mL de propilenglicol. Agitar hasta homogenizar.
3. Adicionar 10 mL de alcohol etílico, tapan el vaso con papel parafilm, mezclar hasta homogenizar.
4. Incorporar 56 g de tilmicosina fosfato (equivalente a 40g de tilmicosina base), la incorporación se realiza muy lentamente evitando la formación de grumos. Agitar hasta homogenizar.
5. Agregar 5 g de poloxámero 188, agregar lentamente para que se vaya homogenizando. Refrigerar (4 °C) la solución, durante 1 hora, agitar por 5 min.
6. Refrigerar durante 24 horas; agitar hasta obtener la completa disolución del poloxámero.
7. Solicitar el análisis del departamento de control de calidad, este muestreará para efectuar el estudio y aprobará o rechazará de acuerdo al resultado.

Elaboración de 100 mL de Tilmicosina L.A. al 40%

Fórmula: Til-Exp-H

Alcohol etílico	10 mL
Poloxámero 407	5 g
Propilenglicol	10 mL
Tilmicosina fosfato	56 g
N metilpirrolidona	0.1 mL
Agua destilada cbp	100 mL

Procedimiento

1. En un vaso de precipitados con capacidad para 250 ml, limpio y seco. Transferir 18.9 mL de agua destilada, medidos con una probeta de 100 mL.
2. Añadir 10 mL de propilenglicol. Agitar hasta homogenizar.
3. Adicionar 10 mL de alcohol etílico, tapar el vaso con papel parafilm, mezclar hasta homogenizar.
4. Incorporar 56 g de tilmicosina fosfato (equivalente a 40 g de tilmicosina base), la incorporación se realiza muy lentamente evitando la formación de grumos. Agitar hasta homogenizar.
5. Agregar 0.1 mL de N-metilpirrolidona. Agitar hasta homogenizar
6. Agregar 5 g de poloxamero 407, agregar lentamente para que se vaya homogenizando. Refrigerar (2 a 8°C) la solución, durante 1 hora, agitar por 5 min.
7. Refrigerar durante 24 horas; agitar hasta obtener la completa disolución del poloxámero.
8. Solicitar el análisis del departamento de control de calidad, este muestreará para efectuar el estudio y aprobará o rechazará de acuerdo al resultado.

Nota: anterior a estos prototipos, se determino que al 8% y 10% de poloxamero, las concentraciones plasmáticas de tilmicosina fueron demasiado bajas en los modelos en ratas (< 0.1 µg/ml en todo el tiempo de sangrado como máximo). Por ahorro de espacio se omiten estos ensayos.

6.4 Estudios *in vivo*: ratas

Después del diseño de varios sistemas matriciales de tilmicosina de liberación prolongada se seleccionaron cuatro con base en los siguientes criterios:

- Estabilidad en condiciones de laboratorio
- Baja viscosidad y alta inyectabilidad (evaluada subjetivamente)
- Turbidez indicativa de mala disolución
- Dolor a la inyección mediante un ensayo previo en ratas con los siguientes criterios: tiempo en manifestar dolor por medio de vocalizaciones, dolor al tacto en el sitio de aplicación.

Se utilizaron 240 ratas Wistar, 4 grupos de 48 animales, usando 2 dosis diferentes para cada prototipo y 1 grupo con el fármaco de referencia (Micotil® de ELANCO Animal Health). Las ratas tuvieron un peso promedio de 345 g y 3 meses de edad. Los animales se mantuvieron sin tratamiento antibacteriano o de otra índole al menos 30 días previos, se les proporcionó agua y alimento *ad libitum* Chow 5001® (Purina México, México). Se utilizó la vía SC en todos los grupos y las siguientes dosis: 30 mg/kg (2 repeticiones), 100 mg/kg (2 repeticiones). La inyección se realizó bajo anestesia a fin de poder hacer un seguimiento electrocardiográfico.

Los grupos fueron tratados de la siguiente manera.

Dosis	Til-Exp-A	Til-Exp-B	Til-Exp-C	Til-Exp-D	Micotil
30 mg	24 ratas	24 ratas	24 ratas	24 ratas	24 ratas
100 mg	24 ratas	24 ratas	24 ratas	24 ratas	24 ratas

El protocolo anestésico empleado fue xilazina a una dosis de 15 mg/kg, vía intramuscular y pentobarbital a una dosis de 20 mg/kg vía intraperitoneal.

Se evaluó en las ratas la posible cardiotoxicidad de la siguiente manera: una vez que las ratas estuvieron bajo anestesia general, se obtuvo registro electrocardiográfico en derivada II, fijando los electrodos en los cuatro miembros mediante un electrodo insertado en la piel.

Se tomó registro basal y seis más después de inyectar el preparado experimental a los 15, 30, 45, 60, 120 y 240 minutos. Se les permitió la recuperación de la anestesia y se les observó durante el tiempo posterior a la inyección que vivieron para evaluar si existían cambios en el comportamiento y signos de toxicidad aguda.

Adicionalmente, se colectaron muestras en 2 ratas por tiempo en todos los grupos mediante punción cardiaca directa bajo anestesia tomando un basal previo a la inyección y después a 1, 1.5, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 96 y 120 horas, obteniéndose un mínimo de 2 ml por tiempo de sangrado. La sangre se centrifugó a 1500 rpm durante 15 minutos, se separó el suero y las muestras se mantuvieron en congelación (- 20°C) hasta el momento de su análisis el cual se realizó antes de 1 mes.

Se procedió a seleccionar 2 de los preparados, tomando en cuenta lo siguiente: Estabilidad, que mantuviera concentraciones terapéuticas de más de 5 días y que no presentara toxicidad en los animales.

Las concentraciones de tilmicosina en suero se determinaron mediante la técnica analítica microbiológica de Bennett *et al.* (1966) que se describe más adelante y con las concentraciones logradas se realizaron análisis farmacocinéticos utilizando al programa PK Analyst⁴ y Origin 8.0⁵ para Windows.

Se obtuvieron las siguientes variables

$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g/mL/h}$) = Área bajo la curva de la integral trapezoidal de la concentración vs tiempo de cero a infinito con extrapolación de la fase terminal

$AUMC$ ($\mu\text{g/mL/h}$) = Área bajo la curva al primer momento

MRT (h) = Tiempo medio de retención

α = constante de distribución

β = ángulo de eliminación

K_{el} = Constante de eliminación desde el compartimiento central

⁴ MicroMath Scientific Software, Salt Lake City, Utah (1993).

⁵ Microcal Origin versión 8.0 Scientific and Technical Graphics in Windows. Microcal Software Inc.

$T_{\frac{1}{2}ab}$ (h) = Vida media de absorción

$T_{\frac{1}{2}\beta}$ ($\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{h}$) = Vida media de eliminación

Vd_{AUC} (mL/kg) = Volumen aparente de distribución del AUC

C_{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) = Concentración plasmática máxima

T_{max} (h) = Tiempo para llegar a C_{max}

Las variables obtenidas se compararon entre sí mediante ANOVA y pruebas t de Bonferroni.

Elección de prototipos: con los datos derivados de la figura 11 y el cuadro 7 y con los criterios de que el preparado mantuviera concentraciones terapéuticas de más de 5 días y que no presentara toxicidad en los animales, se seleccionaron los siguientes preparados para estudios en becerros:

1. Til-Exp-A
2. Til-Exp-B

6.4.1 Fase 3 de campo

Estudio farmacocinético en bovinos en las instalaciones del CEIEPASP

Animales

Se utilizaron 21 becerros divididos aleatoriamente en 3 grupos de 7 bovinos cada uno, el grupo 1 tratado con Til-Exp-A, el grupo tratado 2 Til-Exp-B y el grupo referente con Micotil®. Los animales se mantuvieron sin tratamiento antibacteriano o de otra índole al menos 30 días previos. Los calendarios de desparasitación e inmunización se conservaron conforme a las prácticas de manejo de la granja.

La dosificación se realizó como sigue:

Grupo Referente

Cada bovino se pesó y se dosificó tilmicosina individualmente por vía SC a razón de 10 mg/kg del preparado original (Micotil® de ELANCO Animal Health"referente") sin aplicar más de 10 ml por sitio de aplicación, repartiendo la dosis en el dorso y la tabla del cuello.

Posterior a la administración se realizaron los sangrados a los siguientes tiempos: 15, 30 min, 1, 1.5, 2, 2.5, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 96 y 120 horas, obteniéndose un mínimo de 10

mL por tiempo de sangrado. Las muestras fueron colectadas por punción de la vena yugular con tubos *vacutainer*. Las muestras de sangre se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos, se separó el plasma y las muestras se mantuvieron en congelación (-4°C) hasta el momento de su análisis el cual se realizó antes de 1 mes.

Se realizó un seguimiento de la frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria y trazo electrocardiográfico por medio de un ECG Fukuda cardisuny 501B-III®, colocando electrodos de aguja percutáneos humedecidos con etanol al 70%. Se tomaron registros electrocardiográficos en derivada II a los siguientes tiempos en 1, 4, 8 y 24 horas post administración del fármaco.

Grupo 1

Cada bovino se pesó y dosificó con Til-Exp-A del laboratorio de farmacología de la FMVZ, a una dosis de 30 mg/kg y se obtuvieron muestras de sangre en los tiempos arriba señalados. Las muestras de sangre fueron colectadas y manejadas de la manera ya descrita, al igual que el monitoreo con ECG.

Grupo 2

Cada bovino se pesó y dosificó con Til-Exp-B del laboratorio de farmacología de la FMVZ, a una dosis de 30 mg/kg y se obtuvieron muestras de sangre en los tiempos arriba señalados. Las muestras de sangre fueron colectadas y manejadas de la manera ya descrita, al igual que el monitoreo con ECG.

Todos los animales fueron observados diariamente durante el periodo del estudio, 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 y fotosensibilización.

Las concentraciones de tilmicosina se determinaron mediante técnica analítica de difusión en placa (se describe más adelante) con las concentraciones individuales se realizaron corridas farmacocinéticas utilizando al programa PK Analist y el modelo 3 para determinar su farmacocinética compartamental mediante la siguiente formula general:

$$\text{Concentración (Tiempo)} = \frac{\text{Dosis} \cdot K_{AB}}{\text{Volumen } K_{AB} - K_{elim}} e^{-K_{elim} \cdot \text{Tiempo}} - e^{-K_{AB} \cdot \text{Tiempo}}$$

Se determinaron las siguientes variables $AUC_{0-\infty}$; AUMC; MRT; α ; b ; K_{el} ; $T_{\frac{1}{2}ab}$; $T_{\frac{1}{2}b}$; Vd_{AUC} ; C_{max} ; T_{max} . Los resultados se compararon entre grupos mediante ANOVA y se graficaron utilizando el programa Origin 8.0 para Windows.

6.4.2 Fase 3

Estudio farmacocinético en bovinos en las instalaciones de la FES-C

Dados los resultados obtenidos de la primera prueba de campo se decidió una segunda. Fase de campo en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán prolongando el periodo de muestreo y añadiendo el prototipo Til-Exp-E.

Se seleccionó a los siguientes preparados para estudios en becerros

1. Til-Exp-A
2. Til-Exp-E

Animales

Se utilizaron 21 becerros divididos aleatoriamente en 3 grupos de 7 bovinos cada uno el grupo 1 tratado con Til-Exp-A, el grupo tratado 2 Til-Exp-E y el grupo referente con Micotil®. Los animales se mantuvieron sin tratamiento antibacteriano o de otra índole al menos 30 días previos. Los calendarios de desparasitación e inmunización se conservaron conforme a las prácticas de manejo de la granja. Los animales se observaron durante el periodo de estudio, 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, fotosensibilización y sobre todo taquicardia. La dosificación se realizó como sigue

Grupo Referente

Cada bovino se pesó y se dosificó tilmicosina individualmente por vía SC a razón de 10 mg/kg del preparado original (referente) sin aplicar más de 10 ml por sitio de aplicación, repartiendo la dosis en el dorso y la tabla del cuello.

Posterior a la administración se realizaron los sangrados a los siguientes tiempos: 15, 30 min, 1, 1.5, 2, 2.5, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120, 144, 192 horas, obteniéndose un mínimo de 10 mL por tiempo de sangrado. Las muestras fueron colectadas por punción de la vena yugular con tubos *vacutainer*. Las muestras de sangre se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos, se separó el plasma y las muestras se mantuvieron en congelación (-4°C) hasta el momento de su análisis el cual se realizó antes de 1 semana.

Grupo 1

Cada bovino se pesó y dosificó con Til-Exp-A del laboratorio de farmacología de la FMVZ, a una dosis de 30 mg/kg y se obtuvieron muestras de sangre en los tiempos arriba señalados. Las muestras de sangre fueron colectadas y manejadas de la manera ya descrita. Se monitoreó la frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, presión arterial diastólica y sistólica, presión arterial media, por medio de un ECG en 1, 4, 8 y 24 horas post administración del fármaco.

Grupo 2

Cada bovino se pesó y dosificó con Til-Exp-E del laboratorio de farmacología de la FMVZ, a una dosis de 35 mg/kg y se obtuvieron muestras de sangre en los tiempos arriba señalados. Las muestras de sangre fueron colectadas y manejadas de la manera ya descrita. Se monitoreó la frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, presión arterial diastólica y sistólica, presión arterial media, por medio de un ECG en 1, 4, 8 y 24 horas post administración del fármaco.

6.5 Determinación de las concentraciones séricas de tilmicosina en ratas y bovinos.

Se utilizó el método analítico implementado por Bennett *et al.* (1966) el método se describe brevemente a continuación:

Se utilizó Agar Soya Trypticaseína (Bioxon)⁶ preparado a razón de 40 g/L, siguiendo las indicaciones que marca el producto y se alcalinizó con KOH 0.1N a un pH de 7.8.

Cultivo bacteriano

Se utilizó una cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC (*American Type Culture Collection*) 6538

Estándar bacteriano

En un tubo de tapón de rosca se colocan 5 ml de agua destilada y una asada del cultivo bacteriano joven (resembrado 24 horas antes) de *Staphylococcus aureus* y por medio de los estándares de Mc Farland⁷ se realizaron los ajustes necesarios a la dilución para obtener una concentración al 0.5 de Mc Farland.

La turbidez al 0.5 de Mc Farland se obtuvo por medio de un espectrofotómetro a una transmitancia del 60-70 %, la cual corresponde a una concentración bacteriana de 1×10^8

Preparación de las placas

En un refractario tipo Pirex[®] de 21 X 20 cm, estéril, se colocaron 300 ml de agar y se dejó enfriar durante 10 minutos. Sobre el agar ya frío se depositaron 200 µl de la suspensión bacteriana y por medio de un hisopo estéril se distribuyó homogéneamente sobre todo el agar.

Preparación de las diluciones

Se pesaron 20 g de estándar de tilmicosina (98% de pureza), se colocaron en un matraz y se aforo a 100 ml con agua desionizada (para su disolución se agregaron 0.5 ml de una solución de 0.1 N de NaOH, previo a la adición del agua desionizada). Se marcaron 10 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

⁶ Becton Dickinson de México, SA de CV.

⁷ BioMérieux

cada uno de ellos. Del matraz se tomo 1 ml y se agregó en el tubo 0 se homogenizó y de este se tomo 1 ml y se agregó al tubo 1 se homogenizó se tomo 1 ml y se agrego al tubo 2 y así se continuó hasta completar los 10 tubos, teniendo finalmente las siguientes diluciones:

No	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)
Matraz	200
Tubo 0	20
Tubo 1	10
Tubo 2	5
Tubo 3	2.5
Tubo 4	1.25
Tubo 5	0.625
Tubo 6	0.3125
Tubo 7	0.15625
Tubo 8	0.078125
Tubo 9	0.0390625
Tubo 10	0.01953125

Lectura de las placas

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. Colocando en cada pozo 100 μl de cada una de las diluciones, realizándose 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.

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 Origin 8.0 para Windows y Excel⁸, se obtuvieron las gráficas de milímetros de halo de inhibición vs concentración.

⁸ Microsoft Excel. 2007

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 Bennett *et al* (1966), 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 100µl 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.

Procesamiento de los resultados

De los resultados obtenidos por tiempo de sangrado y por grupo se extrapolaron en la gráfica de concentración vs halo de inhibición obteniéndose así los µg/ml de cada una de las muestras de suero.

7. Resultados

En la figura 10 se presenta la curva de recuperación de tilmicosina en suero (rata o bovino pues no hubo diferencias). Se obtuvo un error intraensayo < 5% y un error interensayo < 4.2 %. El límite inferior de cuantificación fue 0.04 µg/ml con comportamiento lineal ($r = 0.98$) hasta 20 µg/ml. El porcentaje de recuperación a partir de sueros fortificados fue de 92%. Se consideró adecuado el límite de cuantificación para el seguimiento de los perfiles séricos de los preparados experimentales. En la figura 11 y 12 se presentan los perfiles séricos de los preparados experimentales Til-Exp-A, Til-Exp-B, Til-Exp-C, Til-Exp-D y Micotil® en ratas wistar y los valores farmacocinéticos derivados de éstos se presentan en el cuadro 7 y 8, destacando las diferencias estadísticas entre grupos.

7.1 Cardiotoxicidad en ratas

No se detectó taquicardia ni alteración del trazo electrocardiográfico en ningún ensayo realizado con preparado experimental y se detectó que el 100% de las ratas se recuperaban de la anestesia y dosificación con tilmicosina. Tampoco hubo alteraciones del ritmo respiratorio ni de otra índole clínicamente perceptible durante el tiempo de observación. Sin embargo, cuando se realizó el mismo ensayo en ratas, pero utilizando Micotil®, se detectó una severa taquicardia de cerca del 40% de las ratas tratadas con dosis similares (100 mg/kg) a la de los animales tratados con los prototipos.

Al sacrificio posterior a cada sangrado se observó el sitio de inyección y no se identificaron lesiones ni en los animales tratados con los preparados experimentales ni en los animales tratados con Micotil®. No obstante, en los grupos experimentales, se pudo apreciar la presencia de gel a manera de una masa ocupativa de 0.3 mm sin reacción inflamatoria evidente.

7.2 Farmacocinética y cardiotoxicidad en bovinos

En la figura 13 se muestran los perfiles plasmáticos de los preparados Til-Exp-A, Til-Exp-B, y referente, administrados vía SC en bovinos. El cuadro 9 detalla los valores medios \pm 1 DE de las variables farmacocinéticas obtenidas, así como las diferencias estadísticamente significativas entre las variables.

Se repitieron las pruebas al preparado Til-Exp-A y se incluyó el prototipo Til-Exp-E para la prueba de la FES-Cuautitlán. Se uso también el referente (Micotil®). En la figura 14 se muestran los perfiles séricos de los preparados Til-Exp-A y Til-Exp-E administrados vía SC en bovinos. El cuadro 10 detalla los promedios \pm 1 DE de las variables farmacocinéticas obtenidas, así como las diferencias estadísticamente significativas entre las variables. Las reacciones tisulares y los trazos electrocardiográficos fueron muy similares a lo obtenido en la prueba anterior.

Se detectaron algunos efectos secundarios principalmente inflamación y la presencia de edema moderado en el sitio de aplicación cuando se rebasó un volumen de 10 mL/sitio de aplicación en todos los grupos, incluyendo el referente, en el cual ese valor es el máximo recomendado. Esto se puede apreciar en las figuras 15, 16 y 17. En las figuras 18 y 19 se presentan los trazos electrocardiográficos típicos de los bovinos antes y 2 horas después de la administración de 30 mg/kg de los prototipos A y B. No se perciben cambios indicativos de modificaciones en la conducción, ni taquicardia.

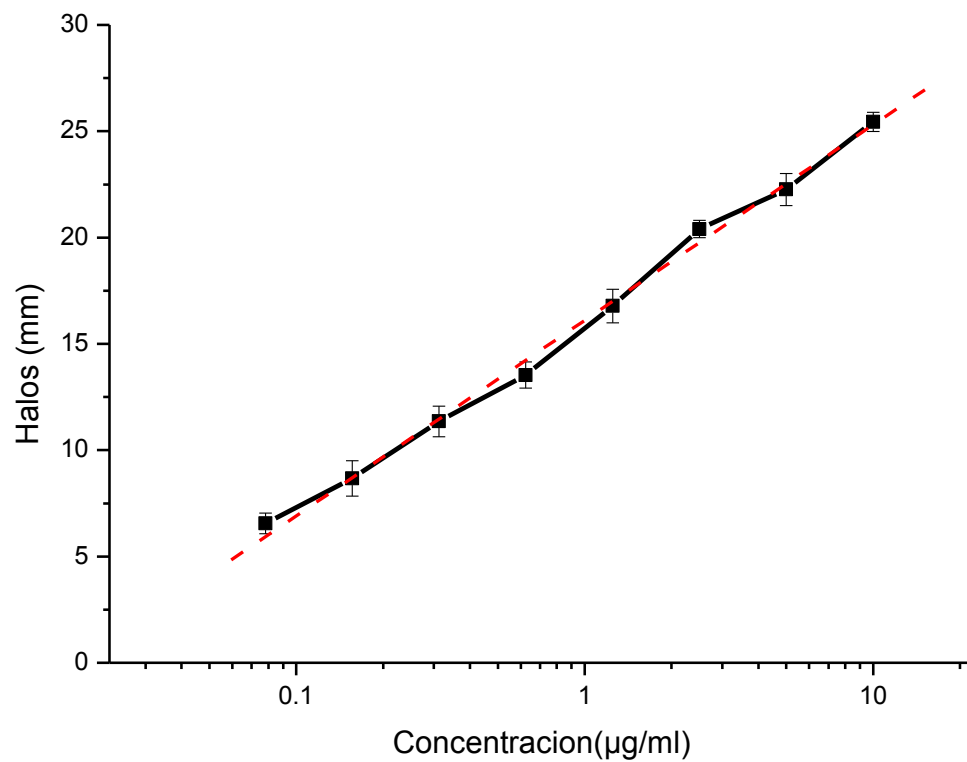


Figura 10. Regresión de la curva de recuperación utilizada para cuantificar la actividad/concentración de tilmicosina y sus posibles metabolitos activos en suero. Solo se presenta una curva dado que no se identificaron diferencias entre suero de ratas y de bovinos ($r^2=0.98$).

Cuadro 7

PROMEDIO DE LAS MEDIAS DE LAS VARIABLES FARMACOCINÉTICAS CALCULADAS POR LA COMPOSICIÓN ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA/CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE TILMICOSINA POR MEDIO DEL ANALISIS NO COMPARTAMENTAL, DE LOS PREPARADOS Til-Exp-A, Til-Exp-B, Til-Exp-C, Til-Exp-D Y EL FARMACO REFERENTE, UTILIZANDO UNA DOSIS DE 30 MG/KG VÍA SUBCUTÁNEA EN RATAS.

	Til-Exp-A	Til-Exp-B	Til-Exp-C	Til-Exp-D	Referente
AUC _{0-∞} (μg·h/mL)	234.38 ± 0.42 ^a	348.69±0.40 ^b	126.66±0.24 ^c	156.77±0.09 ^d	14.14±0.12 ^e
AUMC (μg·h ² /mL)	7800.21± 0.36 ^a	34582.38±0.60 ^b	9702.93±0.20 ^c	21603.07±0.21 ^d	39.6±0.23 ^e
MRT (h)	40.24±0.19 ^a	97.67±0.61 ^b	71.61±0.17 ^c	125.67±0.18 ^d	5.19±0.09 ^e
T _{1/2β} (μg/mL·h)	27.9± 0.19 ^a	67.7±0.14 ^b	49.15±0.12 ^c	86.79±0.09 ^d	3.5±0.16 ^e
T _{1/2ab} (h)	1.75± 0.15 ^a	1.18±0.02 ^b	0.48±0.24 ^c	0.32±0.11 ^d	1.6±0.02 ^e
K _{el} (h ⁻¹)	0.024± 0.39 ^a	0.01±0.12 ^b	0.014±0.09 ^c	0.007±0.074 ^d	0.19±0.02 ^e
C _{max} (μg/mL)	4.18±0.42 ^a	3.62±0.20 ^b	1.82±0.31	1.34±0.14 ^d	1.4±0.24 ^e
T _{max} (h)	4.2± 0.36 ^a	1.95±0.17 ^b	3.26±0.14 ^c	2.59±0.19 ^d	1.5±0.19 ^e

^{a,b,c,d,e} diferentes literales en la misma fila indican diferencias significativas P<0.05

AUC_{0-∞} = Área bajo la curva de la integral trapezoidal de la concentración vs tiempo de cero a ∞ con extrapolación de la fase terminal; AUMC = Área bajo la curva al primer momento; MRT = Tiempo medio de retención; α = constante de distribución; b = tasa constante de eliminación; K_{el} = Constante de eliminación desde el compartimiento central; T_{1/2ab} = Vida media de absorción; T_{1/2b} = Vida media de eliminación; C_{max} = Concentración máxima plasmática; T_{max} = Tiempo para llegar a C_{max}.

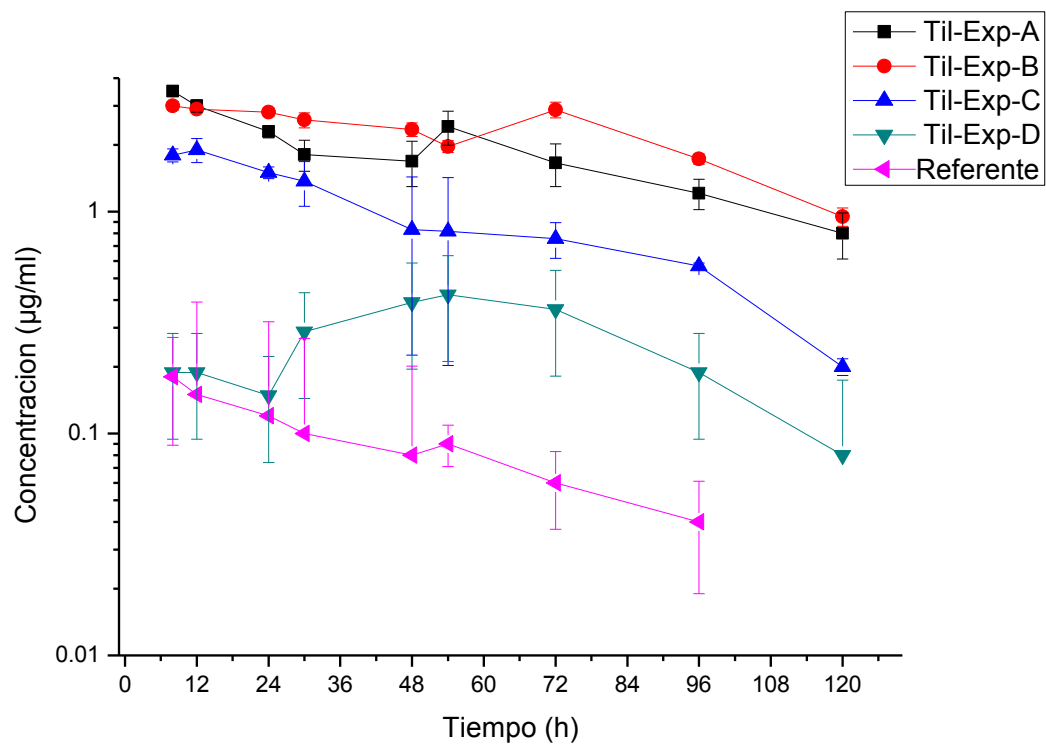


Figura 11. Media \pm 1 DE de las concentraciones séricas de los preparados Til-Exp-A, Til Exp-B, Til-Exp-C, Til-Exp-D y Referente (Micotil), en ratas utilizando una dosis de 30 mg/kg, vía subcutánea.

Cuadro 8

PROMEDIO DE LAS MEDIAS DE LAS VARIABLES FARMACOCINÉTICAS CALCULADAS POR LA COMPOSICIÓN ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA/CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE TILMICOSINA POR MEDIO DEL ANALISIS NO COMPARTAMENTAL, DE LOS PREPARADOS TIL-EXP-A, TIL-EXP-B, TIL-EXP-C, TIL-EXP-D Y EL FÁRMACO REFERENTE, A DOSIS DE 100 MG/KG VÍA SUBCUTÁNEA EN RATAS.

	Til-Exp-A	Til-Exp-B	Til-Exp-C	Til-Exp-D	Referente
AUC _{0-∞} (μg·h/mL)	1891.70±0.37 ^a	3748±0.80 ^b	1022.07±0.48 ^c	6850.01±0.18 ^d	292.37±0.39 ^e
AUMC (μg·h ² /mL)	325607.88±0.85 ^a	1579670.77±1.20 ^b	51531.17±0.39 ^c	6540377.9±0.42 ^d	5525.67±0.48 ^e
MRT (h)	188.27±0.74 ^a	397.45±1.22 ^b	62.12±0.33 ^c	940.84±0.36 ^d	28.22±0.33 ^e
T _{½β} (h)	130.5±0.38 ^a	275.49±0.28 ^b	648.42±0.24 ^c	651.95±0.18 ^d	19.56±.23 ^e
T _{½ab} (h)	1.59±0.37 ^a	9.46±0.03 ^b	0.11±0.47 ^c	0.11±0.18 ^c	9.31±0.39 ^b
K _{el} (h ⁻¹)	0.0053±0.28 ^a	0.0025±0.24 ^a	0.001±0.18 ^a	0.001±0.14 ^a	0.035±0.47 ^a
C _{max} (μg/mL)	9.18±0.59 ^a	10±0-39 ^b	9.8±0.67a	7.37±0.28 ^d	6.93±0.46 ^e
T _{max} (h)	3.6±0.78 ^a	1.3±0.33 ^b	3.1±1.20a	2.2±0.40 ^d	1.61±0.24 ^a

^{a,b,c,d,e} diferentes literales en la misma fila indican diferencias significativas P<0.05

AUC_{0-∞} = Área bajo la curva de la integral trapezoidal de la concentración vs tiempo de cero a ∞ con extrapolación de la fase terminal; AUMC = Área bajo la curva al primer momento; MRT = Tiempo medio de retención; α = constante de distribución; b = tasa constante de eliminación; K_{el} = Constante de eliminación desde el compartimiento central; T_{½ab} = Vida media de absorción; T_{½b} = Vida media de eliminación; C_{max} = Concentración máxima plasmática; T_{max} = Tiempo para llegar a C_{max}.

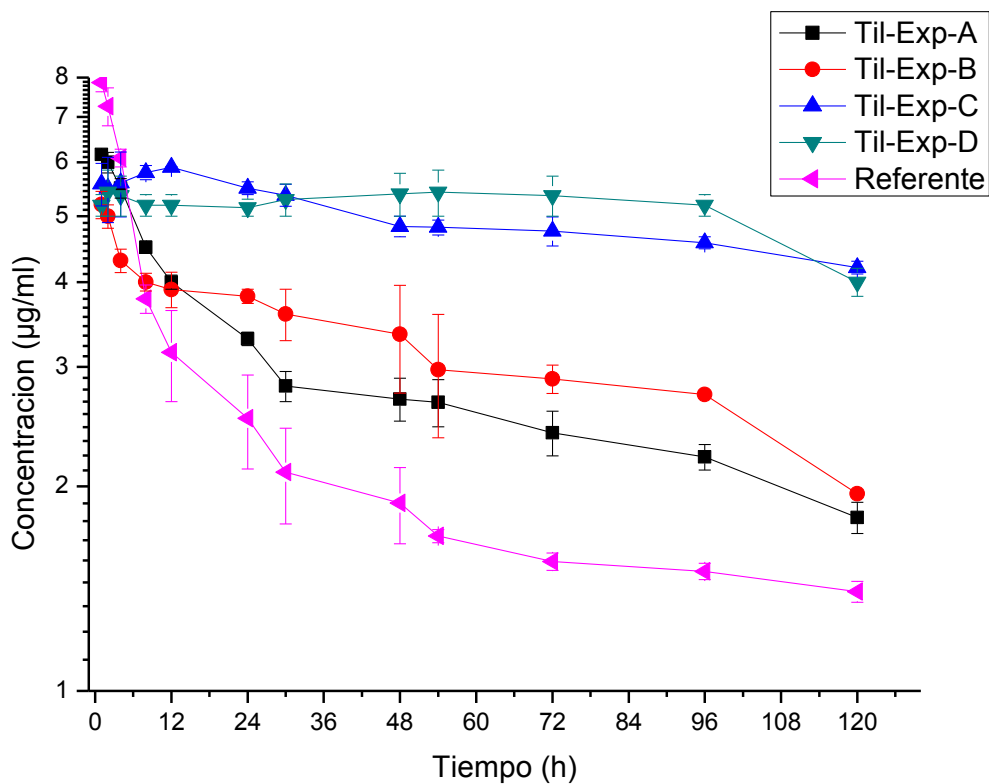


Figura 12. Promedio \pm 1 DE de las concentraciones séricas de los preparados Til-Exp-A, Til-Exp-B, Til-Exp-C, Til-Exp-D y el fármaco referente, en ratas utilizando una dosis de 100 mg/kg, vía subcutánea.

CUADRO 9
PROMEDIO DE LAS MEDIAS DE LAS VARIABLES FARMACOCINÉTICAS CALCULADAS POR LA COMPOSICIÓN ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA/CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE TILMICOSINA POR MEDIO DEL ANALISIS NO COMPARTAMENTAL, DESPUES DE ADMINISTRAR 2 PREPARADOS EXPERIMENTALES A DOSIS DE 30 MG/KG VIA SUBCUTANEA VS EL FARMACO DE REFERENCIA A DOSIS DE 10 MG/KG EN BOVINOS DEL CEIEPASP.

	Referente	Til-Exp-A	Til-Exp-B
AUC _{0-∞} (µg·h/mL)	100.28±0.18 ^a	159.62±0.24 ^b	203.65±0.40 ^c
AUMC (µg·h ² /mL)	1682.22±0.14 ^a	8717.46±0.48 ^b	14928.32±0.22 ^c
MRT (h)	20.31±0.28 ^a	49.55±0.31 ^b	74.53±0.19 ^c
T _{½β} (h)	14.01±0.39 ^a	34.35±0.60 ^b	51.66±0.18 ^c
T _{½ab} (h)	1.11±0.42 ^a	3.21±0.61 ^a	0.01±0.12 ^b
K _{el} (h ⁻¹)	0.05±0.36 ^a	0.02±0.13 ^a	0.02±0.23 ^a
C _{max} (µg/mL)	1.08±0.18 ^a	3.14±0.01 ^b	2.68±0.09 ^c
T _{max} (h)	3.0±0.36 ^a	3.88±0.19 ^b	2.8±0.09 ^a

^{a,b,c} diferentes literales en la misma fila indican diferencias significativas P<0.05

AUC_{0-∞} = Área bajo la curva de la integral trapezoidal de la concentración vs tiempo de cero a ∞ con extrapolación de la fase terminal; AUMC = Área bajo la curva al primer momento; MRT = Tiempo medio de retención; α = constante de distribución; b = tasa constante de eliminación; K_{el} = Constante de eliminación desde el compartimiento central; T_{½ab} = Vida media de absorción; T_{½b} = Vida media de eliminación; C_{max} = Concentración máxima plasmática; T_{max} = Tiempo para llegar a C_{max}.

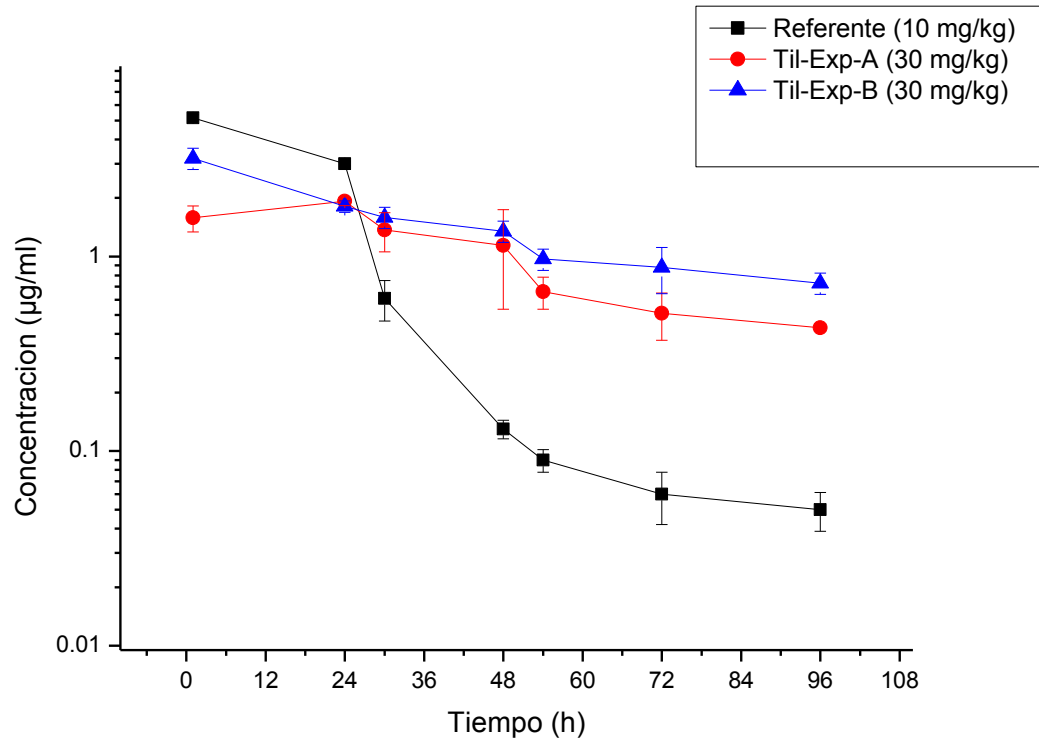


Figura 13. Media \pm 1 DE de las concentraciones séricas vs tiempo de tres preparados de tilmicosina fosfato, vía subcutánea en bovinos del CEIEPASP. (Referente de Micotil® a 10 mg/kg, Til-Exp-A a dosis de 30 mg/kg y Til-Exp-B a dosis de 30 mg/kg).

CUADRO 10
PROMEDIO DE LAS MEDIAS DE LAS VARIABLES FARMACOCINÉTICAS CALCULADAS POR LA COMPOSICIÓN ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA/CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE TILMICOSINA POR MEDIO DEL ANALISIS NO COMPARTAMENTAL, DESPUES DE ADMINISTRAR 2 PREPARADOS A DOSIS DE 30 y 35 mg/kg VIA SUBCUTANEA VS EL FARMACO DE REFERENCIA EN BOVINOS DE LA FES-C.

	Til-Exp-A (30mg/kg)	Til-Exp-E (35mg/kg)	Referente (Micotil®) 10 mg/kg
AUC _{0-∞} (µg·h/mL)	160.11±0.09 ^a	164.58±0.10 ^b	102.28±0.18 ^c
AUMC (µg·h ² /mL)	8895.48±0.11 ^a	9552.65±0.03 ^b	1652.22±0.14 ^c
MRT (h)	52.32±0.06 ^a	58.51±0.01 ^b	21.31±0.28 ^c
T _{1/2β} (h)	35.26±0.06 ^a	40.56±0.03 ^b	14.08±.39 ^c
T _{1/2ab} (h)	3.35±0.7 ^a	4.44±0.40 ^b	1.10±0.42 ^c
K _{el} (h ⁻¹)	0.02±0.95 ^a	0.02±0.88a	0.05±0.36 ^b
C _{max} (µg/mL)	3.25±0.59 ^a	2.79±0.07 ^b	1.00±0.18 ^c
T _{max} (h)	4.01±0.78 ^a	1.15±0.98 ^b	3.06±0.36 ^c

^{a,b,c} diferentes literales en la misma fila indican diferencias significativas P<0.05

AUC_{0-∞} = Área bajo la curva de la integral trapezoidal de la concentración vs tiempo de cero a ∞ con extrapolación de la fase terminal; AUMC = Área bajo la curva al primer momento; MRT = Tiempo medio de retención; α = constante de distribución; b = tasa constante de eliminación; K_{el} = Constante de eliminación desde el compartimiento central; T_{1/2ab} = Vida media de absorción; T_{1/2b} = Vida media de eliminación; C_{max} = Concentración máxima plasmática; T_{max} = Tiempo para llegar a C_{max}.

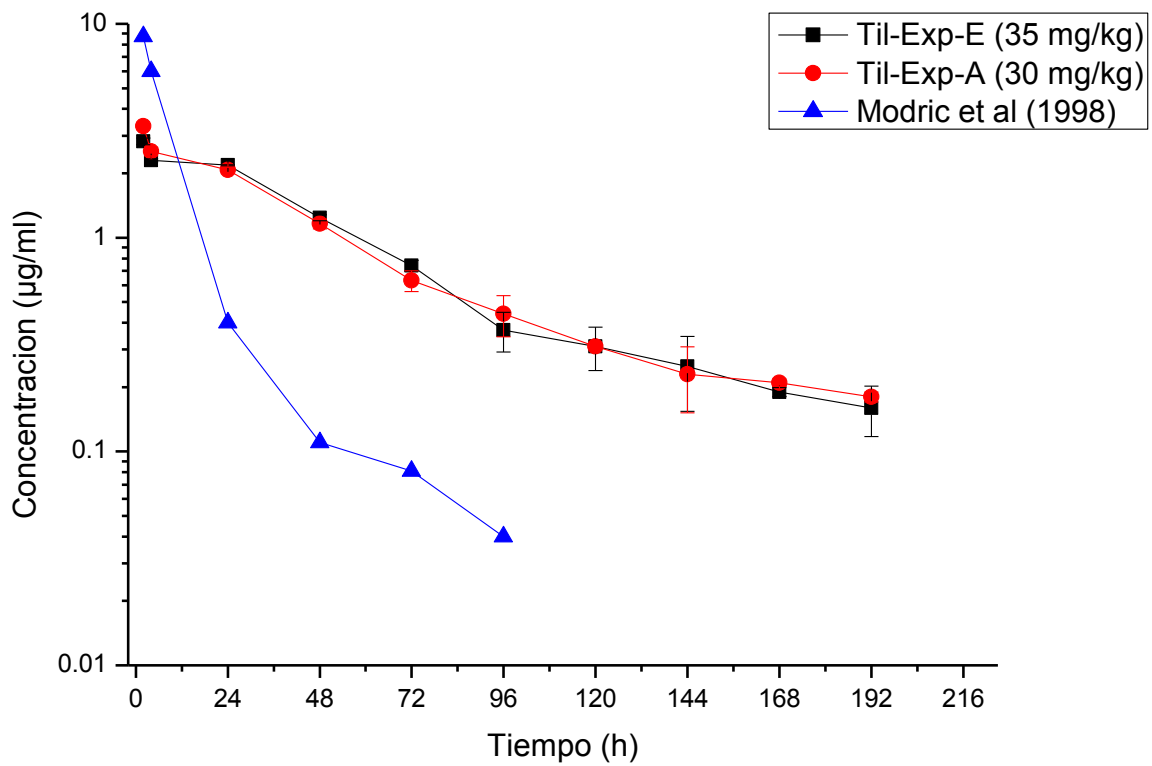


Figura 14. Media \pm 1 DE de las concentraciones de los preparados de tilmicosina fosfato, utilizados bovinos en la FES-C: Til-Exp-A 30 mg/kg/SC, Til-Exp-E 35 mg/kg/SC, y como comparación se presentan los datos de Modric *et al.* (1998).



Figura 15. Fotografía de uno de los animales experimentales en el que resulta evidente la masa ocupativa que genera el preparado Til-Exp-A administrado a dosis de 30 mg/kg. Esta masa es poco o nada inflamatoria en apariencia y desaparece a los 3 días en todos los casos.

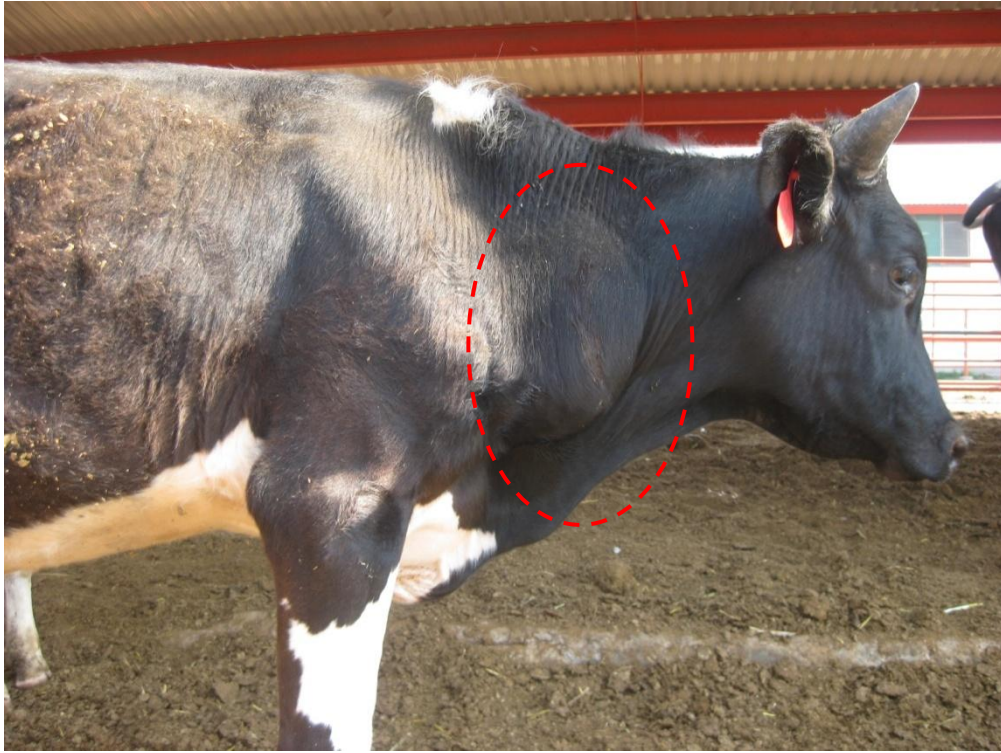


Figura 16. Fotografía que muestra una reacción inflamatoria superpuesta a la masa ocupativa del preparado Til-Exp-E, administrado a dosis de 35 mg/kg. Esto ocurre cuando se aplican más de 10 mL/sitio de aplicación. A pesar del efecto inflamatorio, la reacción desaparece a los 4 días.



Figura 17. Fotografía de uno de los animales experimentales en el que se muestra el edema en el pecho, que es acumulado por efecto de gravedad en esa zona después de la aplicación del prototipo Til-Exp-E administrado a dosis de 35 mg/kg y más de 10/ml por sitio. Este edema desaparece 4 días después.

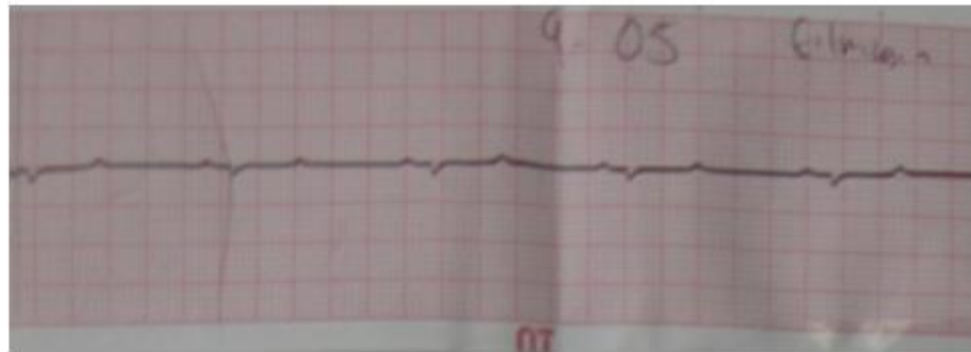


Figura 18. Trazo electrocardiográfico basal y 2 horas después de la aplicación del preparado Til-Exp-A a dosis de 30 mg/kg vía SC y no más de 10 mL/sitio de aplicación.

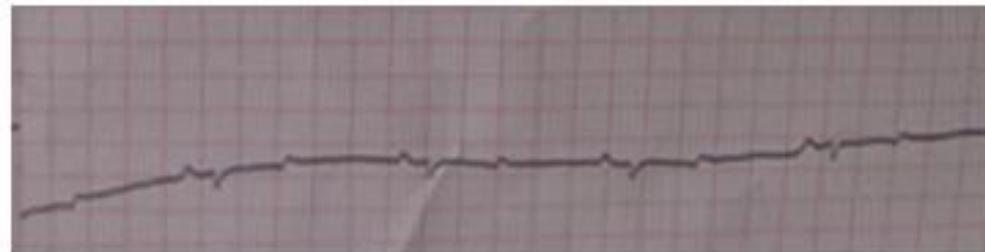


Figura 19. Trazo electrocardiográfico basal y 2 horas después de la aplicación del preparado Til-Exp-B a dosis de 30 mg/kg vía SC y no más de 10 mL/sitio de aplicación.

8. Discusión

El desarrollo de una nueva entidad farmacéutica tiene normalmente, elevados costos financieros para la Industria Farmacéutica Veterinaria, tanto por lo concerniente a la investigación *per se*, como por el costo financiero de la inversión y el riesgo de que los resultados no sean óptimos para derivar el desarrollo tecnológico en un beneficio económico tangible para la empresa. Se considera entonces que una nueva presentación farmacéutica de una entidad tan peligrosa por su cardiotoxicidad como la tilmicosina, tendría al menos un costo entre 500 a 1,000 millones de USD (Magos y Lorenzana-Jiménez 2009). Por esta razón y quizá otras, en México la inversión que se hace en este rubro es mínima, en particular por que el retorno de la inversión es mucho más rápido cuando se trata de formular un genérico. En ese sentido, este trabajo conllevaba dos grandes riesgos: que los costos de investigación se dispararan y no se les pudiera solventar y que no se lograra controlar la cardiotoxicidad del preparado experimental de tilmicosina, con lo que se habría tenido una hipótesis nula.

Para disminuir gastos de la fase experimental, se identificó y solventó un punto de gran relevancia financiera: la técnica analítica cuantitativa. Los costos de cromatografía de alta resolución son muy elevados y aunque confiables en lo cuantitativo, no arrojan actividad o calidad cualitativa. Por ello, para este estudio se eligió la técnica analítica, cualitativa/cuantitativa, de difusión en placa bajo los lineamientos detallados por Bennett *et al.* (1966). Esta técnica tiene la ventaja de ser relativamente económica una vez que se ha identificado el microorganismo hipersensible al principio activo. En este caso un *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Con ésta técnica, se detecta solamente la fracción del principio activo y/o sus metabolitos que retienen actividad antibacteriana. Por ello se logra correlacionar de manera más directa su potencial clínico. En comparación, la determinación de la concentración del principio activo y/o metabolitos por métodos puramente químicos es incapaz de detectar una disminución o anulación de la actividad biológica, ya sea por la presencia de fluidos orgánicos (Fang y Vikepuur, 1995) o por una modificación química no palpable con la técnica analítica empleada.

Con la técnica analítica de difusión en placa se logró una linealidad entre 0.04 µg/mL y 20 µg/mL, intervalo éste que resultó adecuado para los perfiles de tilmicosina obtenidos tanto en rata como en bovinos. Se logró un porcentaje de recuperación del 92%, con lo que se puede considerar que la tendencia primaria del principio activo y/o metabolitos activos queda claramente identificada. Esto coincide con los estudios hechos por Ziv *et al.* (1995) con quienes se pueden hacer comparaciones entre los resultados obtenidos en la literatura con el fármaco referente (Micotil®) y los logrados con ese mismo producto en los controles de los ensayos realizados en este estudio. Los perfiles resultaron muy similares, indistinguibles estadísticamente, lo que añade validez, tanto a los tiempos utilizados para muestreo como a la técnica analítica.

Otro aspecto necesario para reducir costos de investigación fue el escalamiento fraccionado de los prototipos, primero en ratas y posteriormente en bovinos. Aunque no se hicieron estudios *in Vitro*, por ejemplo en cámaras de Franz, para evaluar la tasa de liberación de la tilmicosina de los diferentes polímeros utilizados como se estila en ensayos farmacéuticos, se utilizó un modelo directo de ratas anestesiadas. Los animales elegidos tuvieron un peso promedio de 345 g y provenían del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular, de la UNAM. Estaban destinados al sacrificio en su lugar de origen. Se postuló entonces que para evaluar la toxicidad local y la cardiotoxicidad bajo anestesia se podía hacer uso de este recurso y maximizar la utilización del recurso biótico, ajustando el procedimiento a las normas de manejo ético de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). Evidentemente la toxicidad local y la cardiotoxicidad no se podían evaluar de otra forma.

Además de lo dicho, se consideró prudente utilizar las experiencias anteriores de desarrollos en el departamento de Fisiología y Farmacología de la FMVZ, UNAM (Vargas *et al.*, 2008; Vargas-Estrada *et al.*, 2008a; Vargas-Estrada *et al.*, 2008b) para no explorar en demasía polímeros distintos al poloxamero. En teoría se propone que la tilmicosina no interactúa con el poloxamero mediante una reacción química, más bien se incluye

físicamente en los bloques que constituyen este polímero y posteriormente se le reduce su reología, con base en los hallazgos de González y Sumano (2007), quienes postulan que la presencia de alcoholes, como el etílico e incluso el propilenglicol, pueden reducir drásticamente la viscosidad de un preparado a base de poloxamero, sin afectar notablemente las propiedades retentivas del principio activo. De esta manera se tiene un producto que es relativamente fácil de extraer del frasco y su inyección vía SC no representa un esfuerzo. Este último aspecto es muy importante dada la peligrosidad del producto, tanto para el operario como para los bovinos y en virtud de que los animales que se manejan muy a menudo llegan a los centros de acopio y tienen un comportamiento agresivo. Existen experiencias concretas en campo que han impactado en la venta de preparados farmacéuticos por su baja inyectabilidad relativa, como es el caso del Resflor®⁹

Actualmente el productor cuenta con los siguientes preparados de larga acción para enfrentar un brote clínico o un probable brote de neumonía en esta especie: tilmicosina, tulatromicina, florfenicol y oxitetraciclina (Fazzio y Landoni 2009). Todos estos antibacterianos son tiempo dependientes¹⁰ y obviamente han sido formulados de larga acción para lograr una congruencia mayor de sus proporciones PK/PD, además no es fácil agregar manejo con inyecciones múltiples a los bovinos en explotaciones intensivas y aún extensivas y la manipulación constante es muy costosa.

⁹ Comunicación Personal Dr. Humberto Ramírez. Director de la Unidad de Negocios Ganado en Engorda Intervet México S.A. de C.V.

¹⁰ Desde el punto de vista de eficacia clínica existen dos tipos de antibacterianos divididos así por su congruencia farmacocinética/farmacodinámica (PK/PD):

- *Concentración dependientes (cd)*: Los antibacterianos *cd* requieren, para optimizar su efecto clínico, lograr una elevada concentración pico (C_{max}) para lograr el efecto clínico óptimo, por ejemplo la enrofloxacin requiere una C_{max} de 10 – 12 veces el valor de la CMI del patógeno en cuestión, y los aminoglicósidos de 8 – 10 veces.
- *Tiempo dependientes (td)*: Para los antibacterianos *td*, lo que se requiere para una eficacia clínica óptima es que se mantenga una concentración en o por arriba ligeramente de la CMI del patógeno en cuestión ya sea entre intervalos de dosificación en caso de vida media corta del preparado o por el mayor tiempo posible para preparados de larga acción. Ejemplos de éstos agentes son la tulatromicina, la tilmicosina, el florfenicol, la oxitetraciclina.

Aunque a muchos preparados se les denomina de larga acción (LA en la práctica), en realidad no existe un tiempo preciso para hacerse acreedor a éste calificativo, así que a menudo se requiere de la aplicación de varias dosis para lograr una verdadera LA (Sun *et al.*, 2004; Wernicky Müntener, 2010). Por ejemplo el florfenicol y la tilmicosina únicamente duran en el organismo 48 hrs por lo que en muchas ocasiones los animales que no sanaron con una sola aplicación pueden requerir una segunda y hasta una tercera inyección para sanar. En términos estrictos se logra un efecto LA cuando se detecta una farmacocinética tipo flip/flop¹¹ (Boxenbaum, 1998).

En particular, los macrólidos logran bajas concentraciones en plasma o suero (Anadón y Reeve-Johnson, 1999). Sin embargo, sus concentraciones en los pulmones son considerablemente más altas que las concentraciones plasmáticas (Moredo *et al.*, 2001). Característica que no poseen el resto de los antibióticos arriba mencionados. Los macrólidos eritromicina, tilosina, tilmicosina, espiramicina y tulatromicina han sido aprobados para su uso en el ganado bovino para el tratamiento, control o prevención del CRB (Apley y Coetzee, 2006). La tilmicosina destaca dentro de este grupo por sus propiedades antiinflamatorias y de inmunomodulación, además por poseer 16 átomos, no estimula la expresión de los genes inducibles MLSB de resistencia (Coetzee, 2007). Adicionalmente todos los fármacos de esta familia producen un efecto post antibiótico prolongado (EPA) (Naccari *et al.*, 2001). Tilmicosina y tilosina presentan un EPA por 8 horas cuando se logran concentraciones 8 veces más la CMI (Mestorino y Errecalde, 2004). Varios productos requieren múltiples dosis durante varios días para alcanzar la eficacia terapéutica o preventiva (Fodor *et al.*, 2000; Toutain *et al.*, 2002; Ranade y Hollinger, 2004; Lees *et al.*, 2004; Toutain y Bousquet-Melou, 2006; Huang *et al.* 2009). Tilmicosina-LAE fue desarrollado por única inyección subcutánea (SC) en el ganado para proporcionar la eficacia clínica contra las enfermedades respiratorias y reducir al mínimo el estrés del

¹¹ En cinética del flip-flop, la constante de la absorción es mucho más lenta que la constante de eliminación.

manejo de los animales excesivos y maximizando el cumplimiento de los tratamientos administrados.

De los antibióticos mencionados el único competidor que permanece en el organismo del individuo por un periodo de hasta 10 - 14 días es la tulatromicina (Draxxin®) (Papich y Paul, 2005). Wellman y O'connor, (1997) realizaron un meta-análisis combinando datos de ensayos clínicos al azar de tratamientos donde utilizaron tulatromicina a dosis 2.5 mg/kg, florfenicol a dosis de 40 mg/kg y tilmicosina a dosis de 10 mg/kg. Tulatromicina fue asociada aproximadamente con un 50% en la reducción de retratamiento para abatir el complejo respiratorio bovino comparado con el tratamiento con tilmicosina. Sin embargo, este es un producto caro, que por razones del mercado de la carne en México, nuestros productores no se pueden dar el lujo de aplicarlo como preventivo y como tratamiento en la fase clínica resulta de más lenta acción dado que actúa mejor en un pH ligeramente alcalino y pierde su potencia con la acidificación propia de las infecciones respiratorias. Esto es, tarda de 2 a 3 días en comenzar a hacer efecto en el animal enfermo. Esto ha representado incertidumbre para el clínico que al no ver mejoría inmediata se ve obligado a cambiar o combinar con otro antibiótico. No obstante no hay estudios que validen que hay pérdidas en sus variables productivas por uso clínico terapéutico (y no preventivo) de tulatromicina para el tratamiento de infecciones respiratorias en el bovino (Skogerboe *et al*, 2004). En contraste, en el caso del fármaco más usado para el tratamiento de neumonías, la tilmicosina, esto no sucede. Al contrario es bien sabido en campo y con los clínicos, que la mejoría en el animal se ve de manera casi inmediata, por lo que desde el primer día de tratamiento hay una notable mejoría (Richeson *et al*, 2008). A pesar de ello, siempre hay cabida a la mejora del diseño farmacéutico. La permanencia de la tilmicosina en plasma tras una inyección de 10 mg/kg no sobrepasa las 48-72 hrs por lo que, como se mencionó anteriormente a menudo se requieren redosificaciones. En condiciones de grandes producciones intensivas a menudo no se lleva a cabo la redosificación y con ello se genera una pérdida directa al tener que separar al ganado enfermo o por muertes. Más aún a menudo se pueden presentar curas

clínicas pero no bacteriológicas, condición que solo se refleja en una pobre ganancia de peso (Snowder *et al*, 2008).

De la oxitetraciclina se puede decir que es un recurso muy económico, pero su eficacia clínica es actualmente muy baja. Después de más de 50 años de uso ya existe una buena cuota de resistencias bacterianas (Haas y Smola, 2002; Kollias-Baker, 2005; San Martin *et al*, 2005; Jara, 2007). Al igual que la tilmicosina puede requerir dos tres o cuatro aplicaciones con intervalos de 3–5 días. Sin embargo, Fazzio y Landoni (2009) compararon la eficacia de la tilmicosina (10 mg/kg, SC) vs oxitetraciclina-LA (40 mg/kg, SC) y concluyeron que no hay diferencias en la resolución del complejo respiratorio bovino. Estos resultados son opuestos a lo que se observa en campo y deben tener una explicación ulterior.

El florfenicol-LA (Nuflor®) presenta una problemática similar y aunque el laboratorio que lanzó al mercado el preparado original ha preparado una formulación de más larga acción (Resflor®), su difícil inyectabilidad¹² ha limitado su éxito de manera notable¹³. Catry *et al*, (2008) usaron en forma metafiláctica a la tilmicosina a razón de 12.5 mg/kg vía oral por 5 días vs florfenicol (40 mg/kg, SC), las reacciones adversas observadas de florfenicol fueron pérdida transitoria del apetito y el reblandecimiento de las heces, por lo que esta vía no se recomienda en bovinos.

Thomas *et al*, (2001) usaron marbofloxacin vía intravenosa vs tilmicosina SC, se ha mencionado ya las desventajas de una aplicación IV y al parecer las diferencias en eficacia fueron limitadas.

El preparado experimental A de tilmicosina (Til-Exp-A) de este ensayo generó una Cmax mayor a la lograda con el referente (3.25±0.59 µg/mL vs 1.08±0.18 µg/mL) y la Tmax ocurrió a las 4.01±0.78 h en el primer caso y a las 3.06±0.36 h con el referente. Después de la Cmax, las concentraciones séricas de tilmicosina tienden a decaer muy lentamente con una T½β de 35.26±0.06 h vs 14.08±0.39 h del referente. En concordancia el tiempo

¹² Facilidad para extracción y para inyección

¹³ Comunicación personal Dr. Humberto Ramírez Director de la Unidad de Negocios Ganado en Engorda Intervet México S.A. de C.V.

medio de retención (MRT) para Til-Exp-A fue de 52.32 ± 0.06 h vs 21.31 ± 0.28 h del referente

Como ya se ha mencionado para Til-Exp-A, la eficacia puede depender del mantenimiento de las concentraciones en plasma justo encima de la CMI durante un tiempo prolongado ya que tilmicosina se considera un agente bacteriostático a concentraciones equivalentes a la mínima inhibitoria y las concentraciones superiores a cuatro veces la CMI se consideran bactericidas (Ose, 1987).

En 1994 el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) reporta una CMI de tilmicosina para *Pasteurella spp* de ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ para organismos resistentes, intermedio = 16 $\mu\text{g/ml}$ y sensibles ≤ 8 $\mu\text{g/ml}$, y Shryock *et al*, (1995) una CMI de $1-4$ $\mu\text{g/ml}$ para *P. haemolytica*, $0.5-4$ $\mu\text{g/ml}$ para *P. multocida* y $0.5-2$ $\mu\text{g/ml}$ para *S. aureus*.

Teniendo en cuenta lo anterior es seguro considerar que Til-Exp-A como un preparado de larga acción extendida cumple con las mejores proporciones de PK/PD para controlar las enfermedades bacterianas de los bovinos, comparado con la preparación referente. Además, al ser un antibacteriano tiempo-dependiente, se puede esperar que la eficacia clínica de la preparación Til-Exp-A debe ser superior a 5 días después de su administración SC en comparación con el fármaco referente cuyas concentraciones de suero muestran variaciones de 48 a 72 h.

El preparado farmacéutico de tilmicosina de larga acción extendida que se propone es factible gracias a la tecnología que conlleva su novedoso diseño farmacéutico con matrices poliméricas. De lograrse su desarrollo farmacéutico se podrán obtener concentraciones plasmáticas (y por ende tisulares) por un periodo de aproximadamente 6 días, y no solo se tendrán las ventajas terapéuticas de la tilmicosina LA, sino que por tener un preparado más congruente desde el punto de vista de PK/PD se tendrá una nueva y novedosa entidad farmacológica más potente que tilmicosina y muy probablemente más eficiente que la tulatromicina. Además, a un precio totalmente accesible al productor, esto es:

- Adecuada permanencia en el organismo;
- Rápida respuesta terapéutica
- Precio muy competitivo aun contra los genéricos que no poseen ninguna tecnología en su diseño farmacéutico,

Lo anterior finalmente se traduce en reducción en el costo de manejo, menor estrés y mejoras en las variables productivas.

El mercado para el que está proyectado el presente desarrollo es el de bovinos destinados a la producción de carne y el de becerras de reemplazo en hatos lecheros. También en el control de neumonías en cabras y borregos. En México el mercado natural de bovinos (carne y leche) es de 32,642,134 de cabezas, 8,105,562 de cabezas de borregos y 8,993,221 de cabras y no hay duda de que este rediseño de la tilmicosina a una congruencia PK/PD mayor seguramente tendrá acceso exitoso a otros países productores.

Sin embargo, para incorporar a este prototipo a la clínica es necesario validar su eficacia en casos de CRB y realizar estudios toxicológicos de cardiotoxicidad adicionales, por ejemplo mediante el seguimiento de marcadores séricos bioquímicos cardiacos, como la creatinofosfoquinasa sérica total; lactodeshidrogenasa y las transaminasas glutámica y oxalacética, así como la determinación de tiempos de retiro de rastro.

9. Cuadros y figuras

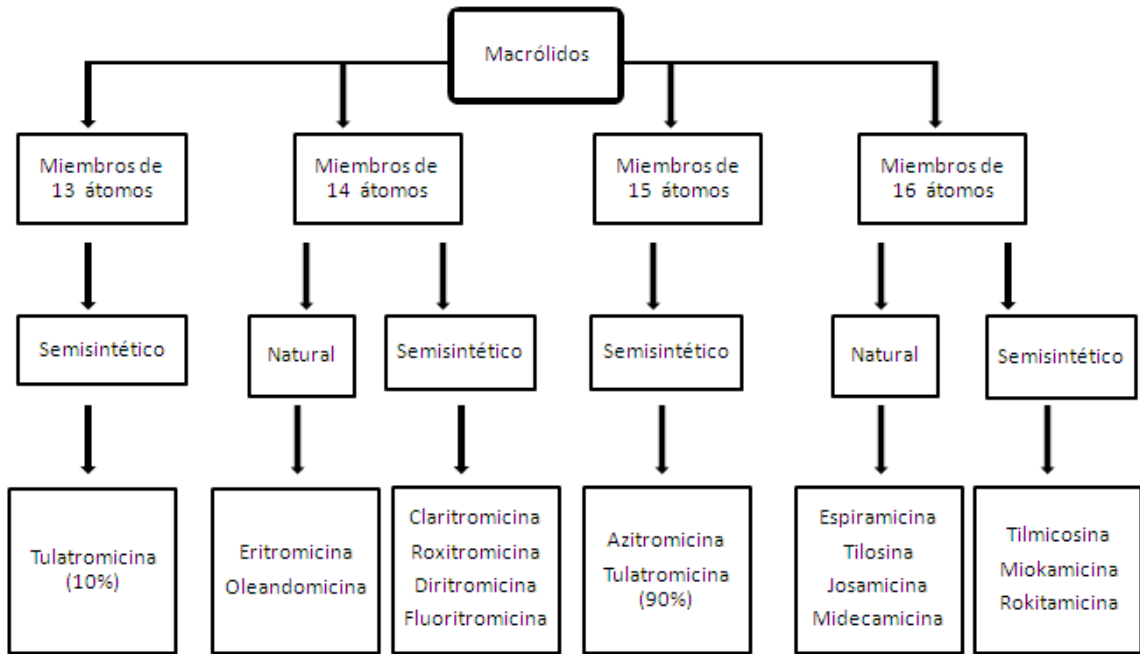
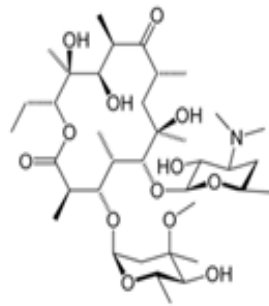
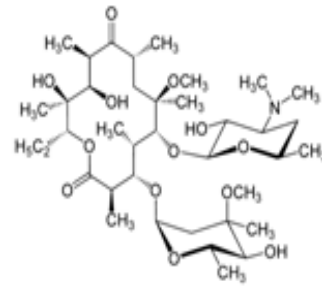


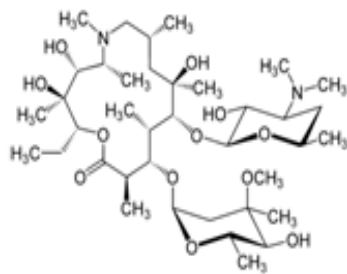
Figura 1. Clasificación de los macrólidos según el número de átomos. Adaptado de Giguere (2006)



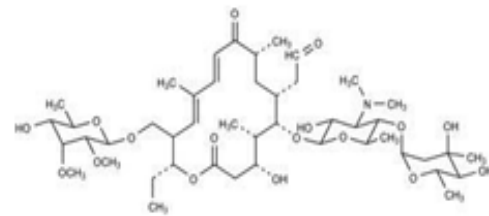
Eritromicina
(14 átomos)



Claitromicina
(14 átomos)



Azitromicina
(15 átomos)



Tilosina
(16 átomos)

Figura 2. Estructura química de algunos macrolidos

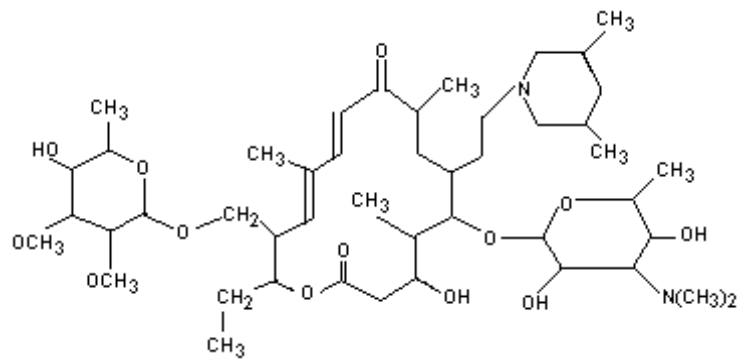


Figura 3. Fórmula estructural de la Tilmicosina

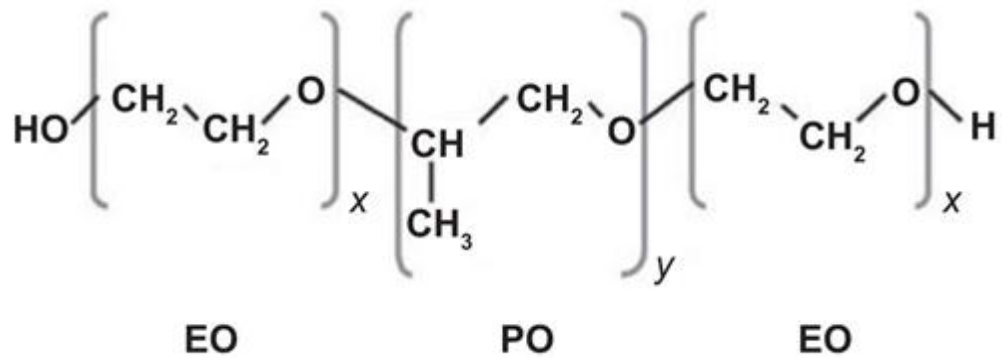


Figura 4. Formula estructural del poloxamero 188. PO, fragmento hidrofóbico central de polioxipropileno; EO, cadenas hidrofílicas de polioxietileno. X, =78 unidades de EO; Y=30 unidades de PO. Adaptado de Karekar *et al*, (2009).

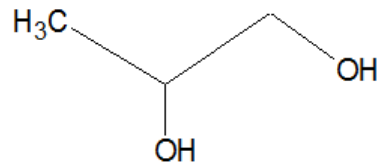


Figura 5. Formula estructural del propilenglicol

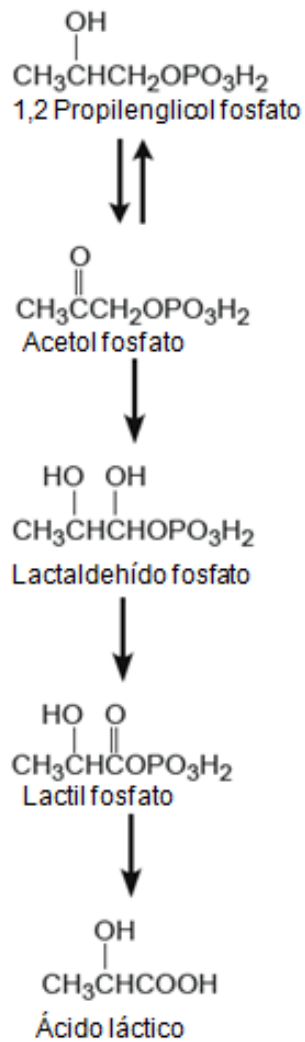


Figura 6. Metabolismo de la fosforilación del Propilenglicol en mamíferos

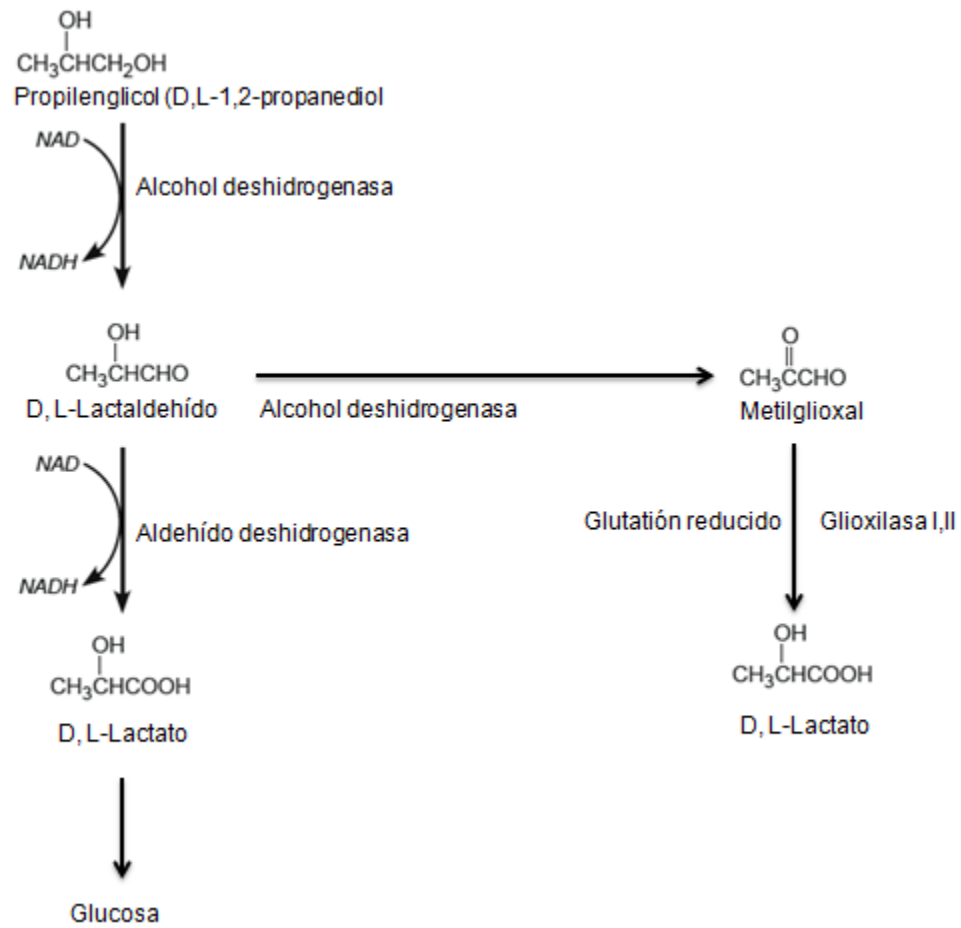


Figura 7. Metabolismo del propilenglicol en mamíferos.

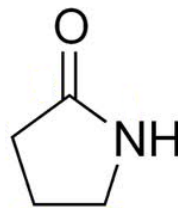


Figura 8. Pirrolidona

Cuadro 1.
DIFERENCIAS EN EL APARATO RESPIRATORIO DE VARIAS ESPECIES. ADAPTADO DE García *et al.*, (1995).

ESPECIE	PV (Kg)	FR	VVP (ml/kg)	VVP MINUTO (L/min/kg)	CRF (L)	CONSUMO DE O2 (ml/min*kg)	PRODUCCION DE CO2 (ml/kg*min)	CR
Equino	475	12	14.1	0.17	18	4.2	4	0.95
Bovino	490	30	7.3	0.22	15	5.4	5.3	0.98
Perro	22	24	11.4	0.3	0.609	15.2	11.2	0.74
Gato	2.45	26	11.9	0.3	0.066	15.8	12	0.75

PV=Peso vivo, FR=Frecuencia respiratoria, VVP= Volumen de ventilación pulmonar, CRF= Capacidad residual funcional, CR= Cociente respiratorio.

Cuadro 2
CLASIFICACIÓN GENERAL DE FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS PARA LOS CUALES HAY INFORMACIÓN DISPONIBLE SOBRE SU ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA, CONCENTRACIÓN O TIEMPO-DEPENDIENTES. ADAPTADO DE McKellar *et al.*, (2004).

Concentración-dependientes	Tiempo-dependientes	Co-dependientes
Aminoglucósidos	β -lactámicos	β -lactámicos ¹
Fluoroquinolonas	Macrólidos (excepto Azitromicina)	Fluoroquinolonas ²
Metronidazol (vs. anaerobios)	Clindamicina Vancomicina	

¹ En relación con la reducción de la resistencia, en la presión de selección, ² Algunos con actividad anaeróbica

Cuadro 3
 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE TILMICOSINA PARA ALGUNOS
 MICROORGANISMOS (CMI). ADAPTADO de Mestorino y Errecalde (2004)

Microorganismo	CMI (µg/ml)
<i>Mannhemia haemolytica</i>	3.12
<i>Pasteurella multocida</i>	6.25
<i>Haemophilus sommus</i>	6.25
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.78
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3.12
<i>Clostridium perfringens</i>	3.12
<i>Clostridium sordellii</i>	3.12
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	0.195
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	3.12
<i>Escherichia coli</i>	>50
<i>Salmonella typhimurium</i>	>50
<i>Moraxella bovis</i>	1
<i>Mycoplasma dispar</i>	0.097
<i>Mycoplasma bovirhinis</i>	0.024
<i>Mycoplasma bovoculi</i>	0.048
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	1.56
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	0.024
<i>Actinomyces pyogenes</i>	0.024

Cuadro 4
 EJEMPLOS DE LOS EFECTOS ANTIINFLAMATORIOS DE LOS MACRÓLIDOS.
 ADAPTADO DE Buret, (2010).

Antibiótico	Parámetros celulares
Efectos sobre los mediadores	
pro-inflamatorios	
Eritromicina, claritromicina, roxitromicina	Reduce la expresión y la producción del gen ICAM-1
Eritromicina, claritromicina, roxitromicina, azitromicina	Reduce la producción de IL-6, IL-8, IL-1 β , TNF α Reducción de las células epiteliales atrayentes de neutrófilos 78 (ENA 78)
Eritromicina	Supresión y producción de endotelina-1 mRNA
Eritromicina, claritromicina	Supresión de la producción de GM-CSF
Eritromicina, roxitromicina	
Efectos en la función de neutrófilos	
Eritromicina, roxitromicina, azitromicina	Inhibición de quimiotaxis de neutrófilos Inhibición de la explosión oxidativa de neutrófilos
Eritromicina	Inhibición de expresión de β_2 integrinas (CD11b/CD18)
Roxitromicina	Inhibición de adhesión de neutrófilos
Tilmicosina, eritromicina, claritromicina, azitromicina, tulatromicina	Inducción de apoptosis de neutrófilos

Cuadro 5

COMPARACIÓN DE LOS PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DE TILMICOSINA, DESPUES DE LA ADMINISTRACIÓN IV Y SC EN BOVINOS. ADAPTADO DE Lombardi *et al*, (2011)

Parámetro	IV		SC	
	Media	DE	Media	DE
C_{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1.56	0.217	0.55	0.247
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	15.6	4.61	17.28	1.64
AUC % extrapolado	1.27	0.41	7.97	1.88
$AUMC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}^2/\text{mL}$)	373	201	751.1	123.2
MRT (h)	23	4.5	43.6	5.11
λ (η^{-1})	0.0251	0.00502	0.022	0.002
$t_{1/2}$ (h)	28	ND	30.83	ND
V_{dss} (L/kg)	15.3	1.47	ND	ND
$V_{d_{area}}$ (L)	28.2	7.71	ND	ND
Cl_s (L/h)	0.686	0.12	ND	ND
T_{max}	ND	ND	4.286	5.42
F	ND	ND	1.11	ND
MAT (h)	ND	ND	20.07	ND

ND= Datos no disponibles

Cuadro 6

FORMULACIONES DE ANTIBIOTICOS DE LARGA ACCIÓN DE USO VETERINARIO.

ADAPTADO DE Sun *et al*, (2004)

Nombre del producto	Forma de dosificación	Ingrediente activo	Excipiente utilizado
Liquamycin [®] LA 200 [®]	Solución concentrada	Oxitetraciclina	2-Pirrolidona
Bio-Mycin [®] 200	Solución concentrada	Oxitetraciclina	Polietilenglicol 400
ProCure [®] 200	Solución concentrada	Oxitetraciclina	2-Pirrolidona
Nuflor [®]	Solución concentrada	Florfenicol	N-metil-2-pirrolidona, propilenglicol, polietilenglicol
Micotil [®]	Solución concentrada	Tilmicosina	Propilenglicol
PEN BP-48 [®]	Suspensión	Penicilina G benzatinica Penicilina G procaina	
PERIOceutic [®] / Doxirobe [®]	Gel	Doxiciclina	N-metil, 2-pirrolidona, Ácido poli-láctico-co-glicólico
Septopal [®]	Cadenas	Gentamicina	Polimetilmetacrilato

Literatura citada

1. Capper, J.L. Sustainability-beef. (2011) The North American Veterinary Conference, Gainesville, USA, Large Animal. Proceedings of the North American Veterinary Conference, Orlando, Florida, USA, pp 36-38, 9.
2. FAO. (2009) Tendencias en la producción bovina. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
3. SIAP. (2010) Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, México resumen nacional. Disponible en:
http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=21&Itemid=330
4. Hartel H, Nikunen S, Neuvonen E, Tanskanen R, Kivela SL, Aho P, Soveri T, Saloniemi. (2004) Viral and bacterial pathogens in bovine respiratory disease in Finland. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 45, 193–200
5. Smith RA. (2004) Feedlot diseases and their control. Proceedings of the WBC congress, Québec, Canada.
6. World Organization for Animal Health (OIE), World Animal Health Information Database (WAHID). (2011) Listed diseases. Animal health in the world.
7. Fodor L, Reeve-Johnson L, Hodge A, and Varga J. (2000) Efficacy evaluations of the use of oral tilmicosin in pneumonic calves. *The Veterinary Journal*. 159, 194–200
8. Forbes B, Ramage C, Sales J, Baggott D and Donachie W. (2011) Determination of the duration of antibacterial efficacy following administration of gamithromycin using a bovine *Mannheimia haemolytica* challenge model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 55, no. 2 p. 831-835.
9. Pardon B, de Bleecker K, Bax B, Callens J and de Prez P. (2010) Identification of infectious agents associated with bovine respiratory disease in white veal calves in Belgium. Proceedings of the 26th Congress of the World Association for Buiatrics, Santiago de Chile.

10. Nickell JS and White BJ. (2010) Metaphylactic antimicrobial therapy for bovine respiratory disease in stocker and feedlot cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food animal practice*. Volume 26, issue 2 , pages 285-301.
11. Tadich N, Gallo C, Echeverria R, Van Schaik G. (2003) Effect of fasting during two periods of confinement and road transport on some blood constituents indicators of stress in steers. *Arch. Med. Vet.* V.35 n.2
12. White B. (2008) Proceeding of the Latin American Veterinary Conference: http://www.ivis.org/proceedings/lavc/2008/white_brad.pdf
13. Valarcher JF and Hägglund S. (2006) Viral respiratory infections in cattle. World Buiatrics Congress, Nice, France.
14. Constable PD, Pyörälä S and Smith GW. (2008) Guidelines for antimicrobial use in cattle. Chapter 9 in guide to antimicrobial use in animals. Edited by Luca Guardabassi, Lars B, Jensen and Hilde Kruse Blackwell Publishing Ltd. ISBN: 978-1-4051-5079-8.
15. Catry B, Duchateau L, Van de Ven J, Laevens H., Opsomer G., Haesebrouck F, de Kruif A. (2008) Efficacy of metaphylactic florfenicol therapy during natural outbreaks of bovine respiratory disease. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 31, 479–487.
16. Carrington C. (2010) Antibacterial sensitivities of the primary respiratory bacterial pathogens in bovine respiratory disease (BRD) complex in feedlot cattle in South Africa. Proceedings of the 26th congress of the World Association for Buiatrics.
17. Lees P., Cunningham F M, Elliott J. (2004) Principles of pharmacodynamics and their applications in veterinary pharmacology. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 27, 397–414
18. McKellar QA, Sanchez Bruni SF, Jones DG. (2004) Pharmacokinetic /pharmacodynamic relationships of antimicrobial drugs used in veterinary medicine. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 27, 503–514.

19. Toutain PL, Bousquet-Mélou A. (2006) Antibiotic dosage regimens based on pk-pd concepts may be an important contribution to the resistance problem. World Buiatrics Congress - Nice, France.
20. Toutain PL, del Castillo JRE, Bousquet- Mélou A. (2002) The pharmacokinetic-pharmacodynamic approach to antibiotics. *Research in Veterinary Science*, 73, 105–114
21. Himelfarb MA, Lorenzutti AM y Martínez VE. (2007) Disposición plasmática y láctea de florfenicol en cabras. *RCCV*. vol. 1 (2). 2
22. Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ. (2005). Mechanisms of quinolone resistance in *escherichia coli* and salmonella: Recent developments. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 25(5):358-373.
23. Fletouris DJ & Papapanagiotou EP. (2008) Tissue residue depletion of oxytetracycline after repeated intramuscular administration of oxysentín 100 in sheep. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 32, 56–61
24. Yancy RJ, Kinney ML, Robert BJ, Geedenought KR, Hamel JC & Ford CW. (1987) Ceftiofur sodium, a broad-spectrum cephalosporin: evaluation in vitro and in vivo in mice. *American Journal of Veterinary Research*, 48, (7) 1050–1053.
25. Moredo A, Landoni MF, Perfumo CJ. (2001) Minimum inhibitory concentration of tilmicosin and erythromycin against *actinobacillus pleuropneumoniae* field strains isolated in Argentina. *Analecta Veterinaria*; 21, 2: 6-11
26. Brown SA. (2005) Role of pharmacokinetics and pharmacodynamics in antimicrobial drug development for animals: an industry perspective. in: 14th biennial symposium of the American Academy of Veterinary Pharmacology and Therapeutics AAVPT, Rockville, MD, USA,

27. Naccari F, Martino D, Giofrè F, Passantino A, de Montis P. (2003) Therapeutic efficacy of tilmicosin in ovine mammary infections. *Small Ruminant Research* 47, 1–9
28. McKellar QA. (2000) Pharmacology and therapeutics. In *Diseases of Sheep*, 3rd ed. Eds Martin, WB. & Aitken, ID. pp. 463–473. Blackwell, Oxford
29. Mestorino N, Errecalde JO. (2004) Tilmicosina: un nuevo antibiótico macrólido de uso veterinario. *Analecta Veterinaria*. 24 (2): 21-28
30. The United States Pharmacopeial Convention. (2007) *Macrolides*. USA.
31. Naccari F, Pellegrino M, Calo M, Licata P, Giofri F, Carli S. (2001) Effectiveness and kinetic behaviour of tilmicosin in the treatment of respiratory. *Veterinary Record*. 148: 773-776
32. Abu-Gharbieh E, Vasina V, Poluzzi E, De Ponti F. (2004) Antibacterial macrolides: a drug class with complex pharmacological profile. *Pharmacological Research* 50 211–222
33. Zalewska-Kaszubska J and Górska D. (2001) Anti-inflammatory capabilities of macrólidos. *Pharmacological Research*,. Vol. 44, No. 6,
34. Munic V, Banjanac M, Kostru S, Nujic K, Bosnar M, Marjanovic N, *et al.* (2011) Intensity of macrolide anti-inflammatory activity in J774A.1 cells positively correlates with cellular accumulation and phospholipidosis. *Pharmacological Research* 64 298–307
35. Buret AG. (2010) Immuno-modulation and anti-inflammatory benefits of antibiotics: The example of tilmicosina. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 74:1–10
36. Diarra MS, Malouin F, Jacques M. (1999) Postantibiotic and physiological effects of tilmicosin, tylosin, and apramycin at subminimal and suprainhibitory concentrations on some swine and bovine respiratory tract pathogens. *International Journal of Antimicrobial Agents* 12, 229–237
37. Coetzee H. (2007) Antimicrobial resistance: is it real? *The North American Veterinary Conference*

38. Womble A., Giguere S, Murthy YVSN, Cox C, Obare, E. (2006) Pulmonary disposition of tilmicosin in foals and in vitro activity against *Rhodococcus equi* and other common equine bacterial pathogens. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 29,561–568
39. Clark C, Dowling PM, Ross S, Woodbury M, Boison JO. (2007) Pharmacokinetics of tilmicosin in equine tissues and plasma. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 31, 66–70.
40. Giguere S. (2006) Macrolides, azalides and ketolides. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. GS, J. F. Prescott, J. D. Baggot, R. D. Walker and P. M. Dowling. Ames. IA, Blackwell Publishing Professional. pp 191-205
41. Tamaoki J, Kadota J, Takizawa H. (2004) Clinical Implications of the Immunomodulatory Effects of Macrolides. *Am J Med.* 117(9A): 5S–11S
42. Committee for Veterinary Medicinal Products. (2010) Tilmicosin. Summary Report. The European Agency for Medicinal Products. Veterinary Medicines Evaluation Unit. <http://www.ema.europa.eu/pdfs/vet/mrls/Tilmicosin1.pdf>
43. Oakes JA, Seifert SA. (2008) American Association of Poison Control Centers Database Characterization of Human Tilmicosin Exposures. *J Med Toxicol.* 4: 2001–2005.
44. Von Essen S, Spencer J, Hass B, List P, Seifert SA. (2003) Unintentional Human Exposure to Tilmicosin (Micotil® 300). *Clinical Toxicology.* 41: 229-233.
45. Yazar E, Oztekin E, Sivrikaya A, Col R, Elmas M, Bas AL. (2004) Effects of different doses of tilmicosin on malondialdehyde and glutathione concentrations in Mice *Acta Vet Brno* 73: 69.72
46. Jordan WH, Byrd RA, Cochrane RL, Ganasono GK, Hoyt JA, Main BW et al., (1993) A review of the toxicology of the antibiotic Micotil 300. *Vet Human Toxicol* 35: 221-226.
47. Modric S, Webb AI, Derendorf H. (1998) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tilmicosin in sheep and cows. *J vet. Pharmacol and Ther.* 21: 444-452.
48. Ziv G, Shem-Tov M, Glickman A, Winkler M, Saran A. (1995) Tilmicosin antibacterial activity and pharmacokinetics in cows. *J vet Pharm Ther* 18: 340-345.

49. Sargeant, J.M., Blackwell, T.E., Wayene, M.S. & Tremblay, R.R.M. (1994) Production practices, calf health and mortality on six white veal farms in Ontario. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 58, 189–195.
50. Van der Fels-Klerx, H.J., Horst, H.S. & Dijkhuizen, A.A. (2000) Risk factors for bovine respiratory disease in dairy young stock in the Netherlands: the perception of experts. *Livestock Production Science*, 66, 35–46.
51. Asim-Kart KY, Karapehlivan M. (2006) Effects of different doses of tilmicosin on some biochemical parameters and antioxidant status in serum and cardiac tissues in mice. *Bull Vet Inst Pulawy* 50, 605-608.
52. Han C, Qi CM, Zhao BK, Cao J, Xie SY, Wang SL, Zhou WZ. (2009) Hydrogenated castor oil nanoparticles as carriers for the subcutaneous administration of tilmicosin: in vitro and in vivo studies. *Vet Pharmacol Ther*. 32: 116-123.
53. Gaynor M, Mankin AS. (2003) Macrolide Antibiotics: Binding Site, Mechanism of Action, Resistance. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 3, 949-960 949
54. Comité FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios. (1998) Evaluación de residuos de ciertos fármacos de uso veterinario en los alimentos: 47 informe del Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios. (Roma Italia).
55. Gonzalez YM and Ghaly ES. (2010) Modified drug release of poloxamer matrix by including water-soluble and water-insoluble polymer Matrices designed by mixture of poloxamer and other polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*; 36(1): 64–71.
56. Bernad Bernad, M J. Ganem Rondero, A. Melgoza Contreras, L M. Quintanar Guerrero, D. (2003) Sistemas de liberación controlada de activos farmacéuticos. Asociación Farmacéutica Mexicana. Tópicos selectos de tecnología farmacéutica. México.
57. García, M I. (2011) Desarrollo y caracterización de mezclas poliméricas como posibles soportes de liberación modificada de fármacos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.

58. Sáez V, Hernáez E, Angulo LS. (2004) Mecanismos de liberación de fármacos desde materiales polímeros. Hidrogeles y Fármacos. Revista Iberoamericana de Polímeros. Volumen 5(1).
59. Sun Y, Scruggs DW, Peng Y, Johnson JR, Shukla AJ. (2004) Issues and challenges in developing long-acting veterinary antibiotic formulations. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 56 1481– 1496
60. Patel HR, Patel RP, Patel MM. (2009) Poloxamers: A pharmaceutical excipients with therapeutic behaviors. *International Journal of Pharm.Tech. Research*. Vol.1, No.2, pp 299-303.
61. Ji-Lai T, Ying-Zheng Z, Zhuo J, Cui-Tao L, Qin-Qin T, Qi X, *et al.*, (2010) Synthesis and characterization of Poloxamer 188-grafted heparin copolymer. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 36(7): 832–838.
62. Karekar P, Vyas V, Shah M, Sancheti P, and Pore Y. (2009) Physicochemical investigation of the solid dispersion systems of etoricoxib with poloxamer 188 *Pharmaceutical Development and Technology*, 14(4): 373–379.
63. Subhashni D, Singh-Joy, Valerie C, McLain, CIR. (2008) Safety Assessment of Poloxamers 101, 105, 108, 122, 123,124, 181, 182, 183, 184, 185, 188, 212, 215, 217, 231, 234,235, 237, 238, 282, 284, 288, 331, 333, 334, 335, 338, 401,402, 403, and 407, Poloxamer 105 Benzoate, and Poloxamer 182 Dibenzoate as Used in Cosmetics. Reviewed by the Cosmetic Ingredient Review (CIR) Expert Panel. *International Journal of Toxicology*, 27(Suppl. 2):93–128.
64. Mullen A, Carter K, and Baillie AJ. (1997) Comparison of the efficacies of various formulations of amphotericin B against murine visceral leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother*; 41: 2089–2092.
65. Moghimi SM., and Hunter A C. (2000) Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine. *Trends Biotechnol.*184:412.
66. Nielsen, NI e Ingvarsten, KL. (2004) Propylene glycol for dairy cows. A review of the metabolism of propylene glycol and its effects on physiological parameters, feed

- intake, milk production and risk of ketosis. *Animal Feed Science and Technology*; 115, 191–213.
67. Sigma-Aldrich. (2008) 398039. SAFETY DATA SHEET. www.sigma-aldrich.com.
 68. NTP-CERHR. (2004) Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Propylene Glycol.
 69. Bennett JV, Brodie JL, Benner EJ, Kirby WMM. (1966) Simplified accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. *Applied Microbiology* 14, 170-177
 70. Ranade VV, y Hollinger MA. (2004) *Drug Delivery Systems*. 2 ed. pp. 309, 310. CRC PRESS. Pharmacology and Toxicology Series. USA
 71. Rowe RC, Sheskey PJ, Owen, SC. eds. (2006) *Handbook of pharmaceutical excipients*. 5th edition. London: Pharmaceutical; Washington, DC. American Pharmacists Association. pp. 535-538, 624-626, 633,634.
 72. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn MF. (2009) *Handbook of pharmaceutical excipients*. 6th Ed. Pharmaceutical Press. pp 506-601.
 73. FDA. (2009) Center for Drug Evaluation / Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products/Database Last Updated: 10/28/2009. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm>
 74. Apley, M.D. & Coetzee, J.F. (2006) Antimicrobial drug use in cattle. In *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, 4th ed. Eds Giguere, S., Prescott, J.F., Baggot, J.D., Walker, R.D. & Dowling, P.M., pp. 485–506. Blackwell Publishing, Ames.
 75. Huang RA, Letendre LT, Banav N, Fischer J and Somerville B. (2009) Pharmacokinetics of gamithromycin in cattle with comparison of plasma and lung tissue concentrations and plasma antibacterial activity. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 33, 227–237, Blackwell Publishing Ltd
 76. Fazio LE y Landoni MF. (2009) Estudio comparativo de la eficacia de oxitetraciclina a la dosis de 40 mg/kg y tilmicosina, combinadas con meloxicam, en el tratamiento de la enfermedad respiratoria bovina en animales de feed lot. *Analecta Veterinaria*; 29 (1): 20-24

77. Wellman NG y O'Connor AM. (1997) Meta-analysis of treatment of cattle with bovine respiratory disease with Tulathromycin. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 30, 234–241
78. Van DJ, Dubeski PL, VanderKop M, Aalhus JL, Bygrove S, Starr WN. (2000) The effect of animal health products on the formation of injection site lesions in subprimals of experimentally injected beef calves. *Can Vet J.* 41:617-622.
79. Tizard IR. *Inmunología Veterinaria*. 6ª Ed. México. Mc-Graw Hill. (2002) pp 242
80. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
81. Magos GA y Lorenzana-Jiménez M. (2009) Las fases en el desarrollo de nuevos medicamentos. Monografía. *Rev Fac Med UNAM Vol. 52 No. 6*
82. Clark CR. (2008) Investigation of the potential use, pharmacokinetics and safety of tilmicosin in horses. Tesis de doctorado de la University of Saskatchewan.
83. Vargas-Estrada D, Gracia-Mora J and Sumano LH. (2008) Pharmacokinetic study of an injectable long – acting parenteral formulation of doxycycline hyclate in calves. *Research in Veterinary Science* 84(3): 477-82
84. Vargas-Estrada D^a, Gutierrez-Olvera L, Juárez RI and Sumano LH. (2008) Pharmacokinetics of doxycycline and tissue concentrations of an experimental long acting parenteral formulation of doxycycline in Wistar rats. *ArzneimForsch/Drug Research.* 58 (6): 310-315
85. Vargas-Estrada D^b, Gutiérrez OL, Juárez I González F and Sumano LH. (2008) Pharmacokinetics after administration of an injectable experimental long-acting parenteral formulation of doxycycline hyclate in goats. *American Journal of Veterinary Research.* 69 (8): 1-6
86. González F y Sumano LH. (2007) Design of two liquid Ibuprofen-poloxamer-limonene or menthol preparations for dermal administration. *Drug Delivery,* 14 (5): 287-293.

87. Donoho AL. (1988) Comparative metabolism of ¹⁴C-tilmicosin in cattle and rats. Unpublished study No. ABC-0395 from Lilly Research Laboratories. Submitted to WHO by Lilly, Basingstoke, UK.
88. Ose, EE. (1987) "In vitro antibacterial properties of EL-870, a new semi-synthetic macrolide antibiotic." J Antibiot (Tokyo) 40(2): 190-4.
89. Skogerboe T, Evans N, Mann D, Weigel D, Hassfurther R, Canning P. (2004) Efficacy of tulathromycin in the treatment of cattle at high risk of bovine respiratory disease. 23rd World Buiatrics Congress, Quebec City.
90. Anadón A y Reeve-Johnson. (1999) Macrolide antibiotics, drug interactions and microsomal enzymes: implications for veterinary medicin. Research in Veterinary Science, 66, 197–203
91. Papich MG y Paul M. (2005) The compliance story: what it is, does, and how to achieve it Proceeding of the NAVC North American Veterinary Conference
92. Richeson JT, Beck PA, Gadberry MS, Gunter SA, Hess TW, Hubbell DS and Jones C. (2008) Effects of on-arrival versus delayed modified live virus vaccination on health, performance and serum infectious bovine rhinotracheitis titers of newly received beef calves. J. Anim. Sci. 86:999-1005.
93. Snowden GD, Van Vleck LD, Cundiff LV and Bennett GL. (2006) Bovine respiratory Disease in feedlot cattle: Enviroment, genetic and economic factors. 1999-2008. Journal of Animal Science, 84, 8:
94. San Martín B, Bravo V, Borie C. (2005) Evaluación de la resistencia antimicrobiana en ganado bovino en Chile, utilizando *E. coli* como bacteria indicadora. Arch. med. vet. 37, Nº 2: 117-123
95. Kollias-Baker C. (2005) Update on antibiotic resistance. The North American Veterinary Conference – Proceedings: 204,205.
96. Haas D y Smola J. (2002) Identification and antimicrobial resistance of *Staphylococci* isolated from cows with subclinical mastitis Proceedings of the WBC Congress, Hannover, Germany

97. Jara MA. (2007) tetraciclinas: un modelo de resistencia antimicrobiana. Avances en Ciencias Veterinarias 22, pp. 49-55, 2007.
98. Boxenbaum H. (1998) Pharmacokinetics tricks and traps: flip-flop models. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 1: 90–91.
99. Shryock TR, White DW, Werner CS and Mitchell Staples J. (1995) Proposed Quality Control Guidelines for Antimicrobial Susceptibility Tests Using Tilmicosin. Journal of Clinical Microbiology, Vol. 33, No. 2. p. 331–335.
100. National Committee for Clinical Laboratory (NCCLS). (1994) Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals; Proposed Standard.
101. FDA (1998) NADA 113-232. Freedom of Information Summary. Supplemental New Animal Drug Application. Liquamycin® LA-200®