



**UNIVERSIDAD DE LEÓN**

*Departamento de Medicina, Cirugía y Anatomía Veterinaria*

**Distribución tisular de una nueva  
formulación de enrofloxacino después  
de la administración intramamaria y  
*sistémica* en un modelo *in vitro* de ubre  
ovina perfundida**

*Memoria que presenta Dña. Cristina López  
Cadenas para la obtención del grado de  
Doctor por la Universidad de León.  
León, Noviembre de 2010.*



*A mis padres,  
Valeriano y Ana*





**INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS  
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)**

Los Dres. D. **José Manuel Gonzalo Orden**, Dña. **M<sup>a</sup> Nélide Fernandez Martínez** y Dña. **M<sup>a</sup> José Díez Liébana** como Directores<sup>1</sup> de la Tesis Doctoral titulada “Distribución tisular de una nueva formulación de enrofloxacinó después de la administración intramamaria y *sistémica* en un modelo *in vitro* de ubre ovina perfundida” realizada por Dña. **Cristina López Cadenas** en el Departamento de Medicina, Cirugía y Anatomía Veterinaria, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firman, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a \_\_\_\_  
de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Fdo.: José Manuel Gonzalo Orden

Fdo.: M<sup>a</sup> Nélide Fernandez Martínez

Fdo.: M<sup>a</sup> José Díez Liébana

---

<sup>1</sup> Si la Tesis está dirigida por más de un Director tienen que constar los datos de cada uno y han de firmar todos ellos.





**ADMISIÓN A TRÁMITE DEL DEPARTAMENTO  
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005 y  
Norma 7ª de las Complementarias de la ULE)**

El Departamento de Medicina, Cirugía y Anatomía Veterinaria en su reunión celebrada el día \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada “Distribución tisular de una nueva formulación de enrofloxacino después de la administración intramamaria y *sistémica* en un modelo *in vitro* de ubre ovina perfundida”, dirigida por los Dres. D. **José Manuel Gonzalo Orden**, Dña. **Mª Nélica Fernández Martínez** y Dña. **Mª José Díez Liébana**, y elaborada por Dña. **Cristina López Cadenas** y cuyo título en inglés es el siguiente “Tissue distribution of a new formulation of enrofloxacin after intramammary and *systemic* administration in the isolated perfused sheep udder”.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

El Secretario,

Fdo.: Juan H. Rejas López

Vº Bº

El Director del Departamento,

Fdo.: Inmaculada Díez Prieto



Esta memoria ha sido realizada con la ayuda de una Beca de Formación de Personal Investigador de la Junta de Castilla y León (EDU/1453/2005) y financiada con el contrato de investigación suscrito con los Laboratorios Syva S.A., titulado *Estudio de liberación y distribución de enrofloxacino en el tejido mamario de oveja a partir de una formulación de uso veterinario.*



# ***AGRADECIMIENTOS***



*A caballo entre dos casas; Dpto. de Medicina, Cirugía y Anatomía Veterinaria y Dpto. de Ciencias Biomédicas.*

*En primer lugar, me gustaría agradecerle al Dr. D. José Manuel Gonzalo Orden, la oportunidad de formar parte de esta pequeña gran familia. Han sido años de intenso trabajo salpicados de momentos entrañables e inolvidables.*

*En segundo lugar, pero no menos importante, agradecerle a la Dra. Dña. Matilde Sierra Vega y al Dr. D. Juan José García Vieitez la oportunidad de poder desarrollar con ellos esta Tesis doctoral. Meses de esfuerzo y trabajo han tenido su recompensa.*

*Por otra parte, quiero hacer un especial agradecimiento a la Dra. Dña. María Nérida Fernández Martínez, por su incansable apoyo y ayuda prestada en este trabajo. Del mismo modo quiero agradecerle a la Dra. Dña. María José Díez Liébana todos los consejos recibidos a lo largo de éste tiempo, tanto profesionales como personales. También agradecerles su apoyo a la Dra. Dña. Ana María Sahagún Prieto y la Dra. Dña. Ángela Pilar Calle Pardo.*

*Agradecerle al Dr. D. José Antonio Rodríguez-Altónaga Martínez su apoyo, su amistad y su confianza en mí. Asimismo, agradecerles a la Dra. Dña. María Asunción Orden Recio, al Dr. D. José Manuel Gonzalo Cordero, a la Dra. Dña. Alicia Ester Serantes Gómez y al Dr. D. Jesús Sánchez García, su apoyo, enseñanzas y consejos recibidos en estos años.*

*A mis compañeros de departamentos. A ellos les agradezco la ayuda que me han prestado en numerosos momentos durante la realización de esta Tesis. Juntos*

*hemos compartido muchas horas de trabajo y esfuerzo. Pero echando la vista atrás, lo que más recuerdo no es el trabajo sino vuestra compañía y todos esos instantes inolvidables que hemos pasado juntos. Cada uno, a su manera, me ha ayudado a crecer personal y profesionalmente. Gracias a todos ellos; Marta, Bea, Ajenjo, María Plata, Víctor (Tarzán), María, Inés, Víctor, Fernando, Xavi, Johanna, Joseba, Diego, Paola, Manu, Iria, Anabel, Raquel, Ruth, Belén, personal del servicio técnico, administrativo y de limpieza.*

*A mis amigos, que siempre han estado ahí cuando los he necesitado. Gracias por todos esos buenos momentos que hemos compartido y por todos aquellos que compartiremos.*

*A mi abuela, a mis hermanos (Oscar y Juan Carlos), a mis cuñadas, a mis tíos, primos y demás familia, gracias por dejarme formar parte de vosotros. Merecen un especial agradecimiento mis padres, Valeriano y Ana, dos seres extraordinarios a los que debo mucho en esta vida. Gracias a mi madre, tanto por su apoyo, cariño y comprensión, como por saber guiarme hacia la luz en aquellos momentos en los cuales yo sólo veía oscuridad. Gracias Mutti!!!*

*Finalmente, a mi marido, Raúl, porque sin su apoyo, consejo, comprensión y cariño este trabajo no hubiera llegado a su fin. Numerosos fueron los momentos difíciles a lo largo de este camino, pero infinitos los momentos maravillosos que he pasado y pasaré a su lado. AM.SE.AM.*

*Llegado este momento, me es imposible no emocionarme al hablar de la personita más importante de mi vida, Marcos. En realidad, nunca lo he visto, ni lo he tocado, ni siquiera he podido oír su voz. Sin embargo, en los últimos meses he notado su presencia y su apoyo incondicional a cada instante. Gracias peque!!!*

*Y como la vida es imprevisible un mes antes de lo previsto, el día 19 de Mayo nació Marcos. Y todo a mi alrededor se detuvo... por fin pude verlo, tocarlo, oír su dulce llanto y regalarle para siempre todo mi amor!!!*

**GRACIAS A TODOS.**

# *ÍNDICE*



<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
Objetivos.....	3
<b>Revisión bibliográfica .....</b>	<b>5</b>
<b>1. Historia y origen.....</b>	<b>5</b>
<b>2. Estructura de las quinolonas .....</b>	<b>10</b>
2.1 Estructura básica .....	10
2.2 Relación estructura-actividad .....	11
2.3 Características físico-químicas .....	18
<b>3. Clasificación de las quinolonas .....</b>	<b>20</b>
3.1 Clasificación química .....	20
3.2 Clasificación por generaciones .....	20
<b>4. Mecanismo de acción .....</b>	<b>22</b>
<b>5. Resistencia bacteriana .....</b>	<b>28</b>
5.1 Resistencia por alteración de las enzimas diana .....	29
5.2 Resistencia por alteración de la permeabilidad bacteriana .....	30
5.3 Resistencia por mecanismos de expulsión activa .....	31
5.4 Resistencia mediada por plásmidos .....	34
5.5 Mutaciones adaptativas y resistencia .....	34
<b>6. Actividad antibacteriana y efecto postantibiótico.....</b>	<b>36</b>
6.1 Actividad antibacteriana .....	36
6.2 Efecto postantibiótico de las quinolonas .....	41

	Pág.
<b>7. Usos clínicos.....</b>	<b>43</b>
7.1 Espectro de actividad antibacteriana y usos clínicos del enrofloxacino en distintas especies animales .....	43
7.1.1 Ovinos .....	43
7.1.2 Bovinos.....	43
7.1.3 Equinos.....	44
7.1.4 Porcinos .....	44
7.1.5 Caninos.....	45
7.1.6 Felinos .....	46
7.1.7 Aves.....	46
7.1.8 Pequeños mamíferos .....	47
7.1.9 Otras especies .....	48
<b>8. Toxicidad y efectos adversos. Interacciones medicamentosas.....</b>	<b>49</b>
8.1 Toxicidad y efectos adversos.....	49
8.2 Interacciones medicamentosas .....	50
<b>9. Farmacocinética.....</b>	<b>52</b>
9.1 Absorción .....	52
9.2 Distribución .....	66
9.2.1 Unión a proteínas plasmáticas.....	77
9.3 Metabolismo .....	78
9.4 Excreción.....	81
<b>10. La glándula mamaria .....</b>	<b>90</b>
10.1 Origen y desarrollo de la glándula mamaria.....	90
10.2 Anatomía externa.....	93
10.3 Anatomía interna .....	95

	Pág.
10.4 Vascularización.....	99
10.5 Inervación .....	100
10.6 Vasos linfáticos.....	100
10.7 Modelos <i>in vitro</i> de ubre perfundida.....	101
<b>11. Mastitis en ganado ovino.....</b>	<b>103</b>
<b>Material y métodos.....</b>	<b>107</b>
<b>1. Modelo <i>in vitro</i> de ubre ovina perfundida .....</b>	<b>107</b>
1.1 Estudio de viabilidad .....	114
1.2 Administración del fármaco y toma de muestras.....	117
1.2.1 Administración intramamaria.....	117
1.2.2 Administración sistémica/intravenosa.....	117
1.2.3 Toma de muestras .....	118
<b>2. Modelo <i>in vivo</i>: Administración del fármaco y toma de muestras .....</b>	<b>119</b>
<b>3. Reactivos, material y equipos empleados en la preparación del modelo     <i>in vitro</i>, la administración del fármaco y toma de muestras .....</b>	<b>120</b>
<b>4. Método de cuantificación del enrofloxacino .....</b>	<b>123</b>
4.1 Técnica.....	123
4.2 Obtención de la recta de calibrado.....	125
4.3 Exactitud y reproductibilidad del método de cuantificación .....	128
4.4 Extracción y cuantificación de las muestras .....	128
4.5 Determinación del porcentaje de recuperación .....	130
4.6 Reactivos, material y equipos empleados en la cuantificación del enrofloxacino .....	139

	Pág.
<b>5. Análisis farmacocinético .....</b>	<b>141</b>
5.1 Análisis compartimental .....	141
5.2 Análisis no compartimental .....	143
<b>6. Análisis estadístico .....</b>	<b>145</b>
<b>7. Programas utilizados en el análisis farmacocinético y estadístico .....</b>	<b>145</b>
<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>147</b>
<b>1. Modelo <i>in vitro</i> de ubre ovina perfundida .....</b>	<b>148</b>
1.1 Estudio de viabilidad del modelo .....	148
1.1.1 Parámetros bioquímicos .....	148
1.1.2 Valoración macroscópica .....	155
1.1.3 Estudio histológico .....	159
1.2 Administración <i>sistémica</i> de enrofloxacino .....	161
1.2.1. Solución Tyrode .....	161
1.2.2. Tejido mamario .....	182
1.3 Administración intramamaria de enrofloxacino .....	190
1.3.1. Solución Tyrode .....	190
1.3.2. Tejido mamario .....	199
<b>2. Ovejas vivas.....</b>	<b>207</b>
2.1 Administración intramamaria de enrofloxacino .....	207
2.1.1. Plasma .....	207
2.1.2. Tejido mamario .....	213
<b>3. Relación farmacocinética/farmacodinamia (Pk/Pd).....</b>	<b>222</b>

Pág.

<b>Conclusiones .....</b>	<b>245</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>247</b>



**Relación de figuras**

<b>Figura</b>	<b>Pág.</b>
1. Estructura química de las principales quinolonas no fluoradas, fluoradas de segunda generación y fluoradas más modernas .....	7
2. Estructura básica o núcleo común de las quinolonas.....	10
3. Relación estructura-actividad .....	12
4. Posición 3 y 4.....	13
5. Posición 1.....	14
6. Posición 8.....	15
7. Posición 7.....	15
8. Posición 6.....	16
9. Estructura química del enrofloxacino y de su metabolito, el ciprofloxacino .....	16
10. Estructura quinolónica común .....	17
11. Representación esquemática de la estructura de las subunidades A y B de la DNA-girasa de <i>E. coli</i> (Fisher <i>et al.</i> , 1992) .....	23
12. Esquema de los sucesivos plegamientos del DNA por acción de la DNA-girasa (Smith, 1986) .....	24
13. Resistencia por alteración de la permeabilidad de la membrana celular externa. ....	31
14. Sistema de transporte activo en <i>E. coli</i> .....	33
15. Entrada y expulsión de las quinolonas en <i>E. Coli</i> .....	33
16. Morfología externa de la ubre ovina: a) Vista lateral. b) Vista posterior .....	94
17. Estructura interna de la ubre (Hospes y Seeh, 1999).....	95
18. Estructura del alvéolo mamario .....	97
19. Estructura interna de la ubre ovina. PG: parénquima glandular; CM: cisternamamaria; O: orificio del pezón; CP: esfínter cricoideo (Ruberte <i>et al.</i> , 1994 y Caja <i>et al.</i> , 2000).....	98
20. Vascularización de la glándula mamaria de la oveja (Climent <i>et al.</i> , 2005) .....	101
21. Oveja Assaf.....	107
22. Fármacos utilizados en el protocolo de eutanasia.....	108
23. a) Disección de la glándula mamaria. b) Arteria y vena mamaria en su salida del canal inguinal.....	110

	Pág.
Figura	
<b>24.</b> a) Fijación de la ubre al soporte metálico. b) Canulación de la arteria y vena mamaria. c) Catéter intravenoso.....	111
<b>25.</b> a) Circuito abierto (fase de equilibrio). b) Circuito cerrado (recirculación) .....	114
<b>26.</b> a) Prueba Trypan azul: administración. b) Distribución del colorante por los vasos subcutáneos.....	115
<b>27.</b> Necropsia: distribución del colorante (Trypan azul) por la glándula mamaria .....	116
<b>28.</b> a) Desinfección del pezón. b) Administración intramamaria de la pomada a base de enrofloxacino .....	117
<b>29.</b> Toma de muestras .....	118
<b>30.</b> Canulación de la vena yugular en oveja .....	119
<b>31.</b> Cromatograma obtenido tras la inyección de: a) patrón de enrofloxacino (10µg/ml).....	123
<b>31 (continuación).</b> Cromatograma obtenido tras la inyección de: 1b) solución Tyrode blanco tras extracción; 2b) tejido mamario blanco tras extracción; 3b) leche blanco tras extracción; 4b) plasma blanco tras extracción; 1c) patrón de enrofloxacino (10µg/ml) en solución Tyrode tras extracción; 2c) patrón de enrofloxacino (10µg/ml) en tejido mamario tras extracción; 3c) patrón de enrofloxacino (10µg/ml) en leche tras extracción; 4c) patrón de enrofloxacino (10µg/ml) en plasma tras extracción .....	124
<b>32.</b> Rectas de calibrado: (A) intervalo entre 0,1 y 1 µg/ml; (B) intervalo entre 2 y 100 µg/ml.....	127
<b>33.</b> Esquema de los modelos farmacocinéticos para la vía intravenosa .....	142
<b>34.</b> Evolución de las concentraciones medias de glucosa en solución Tyrode a lo largo del periodo de perfusión, en 26 ovejas .....	150
<b>35.</b> Evolución de las concentraciones medias de lactato en solución Tyrode a lo largo del periodo de perfusión, en 26 ovejas .....	152
<b>36.</b> Evolución de los valores medios de pH en solución Tyrode a lo largo del periodo de perfusión, en 26 ovejas. ....	155
<b>37.</b> Prueba de Trypan azul positiva. ....	156
<b>38.</b> Edema macroscópico.....	158
<b>39.</b> a) Corte histológico de tejido mamario perfundido. H&E.3,87x. b) Detalle de la imagen anterior. H&E.25x.....	160

Figura	Pág.
40. a) Corte histológico de tejido mamario no perfundido. H&E.3,87x. b) Detalle de la imagen anterior. H&E.25x.....	160
41. Curvas individuales de concentración de enrofloxacino en solución Tyrode tras la administración <i>sistémica</i> de 5mg/kg en el modelo de ubre perfundida. Ovejas 1 a 3.....	162
42. Curvas individuales de concentración de enrofloxacino en solución Tyrode tras la administración <i>sistémica</i> de 5mg/kg en el modelo de ubre perfundida. Ovejas 4 a 6.....	163
43. Curvas individuales de concentración de enrofloxacino en solución Tyrode tras la administración <i>sistémica</i> de 5mg/kg en el modelo de ubre perfundida. Ovejas 7 a 9.....	164
44. Curvas individuales de concentración de enrofloxacino en solución Tyrode tras la administración <i>sistémica</i> de 5mg/kg en el modelo de ubre perfundida. Ovejas 10 a 12.....	165
45. Evolución de las concentraciones medias de enrofloxacino en solución Tyrode tras la administración <i>sistémica</i> de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida (n=12) ....	166
46. Curvas individuales de concentración de enrofloxacino en tejido mamario perfundido (—●—) y en tejido mamario contralateral no perfundido (—▲—) a las distintas alturas de muestreo, tras la administración <i>sistémica</i> de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida. Ovejas 1 a 6. ....	184
47. Curvas individuales de concentración de enrofloxacino en tejido mamario perfundido (—●—) y en tejido mamario contralateral no perfundido (—▲—) a las distintas alturas de muestreo, tras la administración <i>sistémica</i> de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida. Ovejas 7 a 12. ....	185
48. Curva media de enrofloxacino en tejido mamario perfundido (—●—) y en tejido mamario contralateral no perfundido (—▲—) a las distintas alturas de muestreo, tras la administración <i>sistémica</i> de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida (n=12).. ....	186
49. Curvas individuales de concentración de enrofloxacino en solución Tyrode tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida. Oveja 1 a 3. ....	192
50. Curvas individuales de concentración de enrofloxacino en solución Tyrode tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida. Oveja 4 a 6. ....	193
51. Curvas individuales de concentración de enrofloxacino en solución Tyrode tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida. Oveja 7 a 9. ....	194

## Figura

<b>52.</b> Curvas individuales de concentración de enrofloxacino en solución Tyrode tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida. Oveja 10 a 12.....	195
<b>53.</b> Curvas individuales de concentración de enrofloxacino en solución Tyrode tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida. Oveja 13 a 14.....	196
<b>54.</b> Evolución de las concentraciones de enrofloxacino tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida (n=14).....	197
<b>55.</b> Relación entre las concentraciones medias de enrofloxacino en solución Tyrode tras la administración sistémica de 5 mg/kg (—■—) y tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20 % (m/m)) (—●—) en el modelo de ubre perfundida (n = 12 y n = 14 respectivamente).....	198
<b>56.</b> Curvas individuales de concentración de enrofloxacino en tejido mamario perfundido (—●—) y en tejido mamario contralateral no perfundido (—▲—) a las distintas alturas de muestreo, tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida. Ovejas 1 a 6. ....	201
<b>57.</b> Curvas individuales de concentración de enrofloxacino en tejido mamario perfundido (—●—) y en tejido mamario contralateral no perfundido (—▲—) a las distintas alturas de muestreo, tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida. Ovejas 7 a 12. ....	202
<b>58.</b> Curvas individuales de concentración de enrofloxacino en tejido mamario perfundido (—●—) y en tejido mamario contralateral no perfundido (—▲—) a las distintas alturas de muestreo, tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida. Ovejas 13 y 14. ....	203
<b>59.</b> Curva media de enrofloxacino en tejido mamario perfundido (—●—) y en tejido mamario contralateral no perfundido (—▲—) a las distintas alturas de muestreo, tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida (n=12). ....	203

Figura	Pág.
<b>60.</b> Concentraciones medias de enrofloxacino en tejido mamario perfundido y en tejido mamario contralateral no perfundido a las distintas alturas de muestreo, tras la administración <i>sistémica</i> de 5 mg/kg y tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida (n=12 y n=14 respectivamente).....	206
<b>61.</b> Curvas individuales de concentración plasmática experimental-tiempo para el enrofloxacino tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)). Ovejas 1 a 3. ....	208
<b>62.</b> Curvas individuales de concentración plasmática experimental-tiempo para el enrofloxacino tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)). Ovejas 4 a 6. ....	209
<b>63.</b> Evolución de las concentraciones plasmáticas medias de enrofloxacino tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) a 6 ovejas vivas. ....	210
<b>64.</b> Relación entre las concentraciones medias de enrofloxacino en plasma y solución Tyrode tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en ovejas vivas (—●—) y en el modelo de ubre perfundida (—■—).....	212
<b>65.</b> Curvas individuales de concentración de enrofloxacino en tejido mamario a las distintas alturas de muestreo tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)). Ovejas 1 a 6.....	214
<b>66.</b> Curva media de concentración de enrofloxacino en tejido mamario a las distintas alturas de muestreo tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m))a 6 ovejas vivas. ....	215
<b>67.</b> Relación entre las concentraciones medias de enrofloxacino en tejido mamario a las distintas alturas de muestreo tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en ovejas vivas (—●—) y en el modelo de ubre perfundida (—■—).....	217
<b>68.</b> Valores experimentales de las concentraciones medias de enrofloxacino en tejido mamario a las distintas alturas de muestreo tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo <i>in vitro</i> y en ovejas vivas y sus ajustes correspondientes realizados con el modelo lineal y monoexponencial decreciente.....	219
<b>69.</b> Representación gráfica de los valores teóricos <i>in vivo</i> predichos utilizando la ecuación: $\text{Concentración} = 478,804 \cdot e^{-0,251 \cdot \text{altura}}$ y los valores medios experimentales <i>in vivo</i> .....	220

## Figura

<b>70.</b> Eficacia antibacteriana del enrofloxacino en solución Tyrode tras la administración <i>sistémica</i> de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida.....	226
<b>71.</b> Eficacia antibacteriana del enrofloxacino en solución Tyrode tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida .....	228
<b>72.</b> Curva media de enrofloxacino en tejido mamario perfundido a las distintas alturas de muestreo, tras la administración <i>sistémica</i> de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida, teniendo en cuenta los valores de CIM para los microorganismos utilizados como referencia: CIM = 0,5 µg/ml ( <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Mycoplasma agalactiae</i> ); CIM = 0,06 µg/ml ( <i>Escherichia coli</i> y <i>Streptococcus</i> spp) y CIM = 0,03 µg/ml ( <i>Pasteurella haemolytica</i> ). .....	230
<b>73.</b> Curva media de enrofloxacino en tejido mamario contralateral no perfundido a las distintas alturas de muestreo, tras la administración <i>sistémica</i> de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida, teniendo en cuenta los valores de CIM para los microorganismos utilizados como referencia: CIM = 0,5 µg/ml ( <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Mycoplasma agalactiae</i> ); CIM = 0,06 µg/ml ( <i>Escherichia coli</i> y <i>Streptococcus</i> spp) y CIM = 0,03 µg/ml ( <i>Pasteurella haemolytica</i> ). .....	232
<b>74.</b> Curva media de enrofloxacino en tejido mamario perfundido a las distintas alturas de muestreo, tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida, teniendo en cuenta los valores de CIM para los microorganismos utilizados como referencia: CIM = 0,5 µg/ml ( <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Mycoplasma agalactiae</i> ); CIM = 0,06 µg/ml ( <i>Escherichia coli</i> y <i>Streptococcus</i> spp) y CIM = 0,03 µg/ml ( <i>Pasteurella haemolytica</i> ). .....	234
<b>75.</b> Curva media de enrofloxacino en tejido mamario contralateral no perfundido a las distintas alturas de muestreo, tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida, teniendo en cuenta los valores de CIM para los microorganismos utilizados como referencia: CIM = 0,5 µg/ml ( <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Mycoplasma agalactiae</i> ); CIM = 0,06 µg/ml ( <i>Escherichia coli</i> y <i>Streptococcus</i> spp) y CIM = 0,03 µg/ml ( <i>Pasteurella haemolytica</i> ). .....	223
<b>76.</b> Eficacia antibacteriana del enrofloxacino en plasma tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en ovejas vivas ...	240

Figura

**77.** Curva media de concentración de enrofloxacino en tejido mamario a las distintas alturas de muestreo tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) a 6 ovejas vivas, teniendo en cuenta los valores de CIM para los microorganismos utilizados como referencia: CIM = 0,5 µg/ml (*Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma agalactiae*); CIM = 0,06 µg/ml (*Escherichia coli* y *Streptococcus* spp) y CIM = 0,03 µg/ml (*Pasteurella haemolytica*) ..... 242



**Relación de tablas**

	Pág.
<b>Tabla</b>	
1. Propiedades físicas del enrofloxacino y el ciprofloxacino .....	19
2. Clasificación de las quinolonas atendiendo a su estructura química y a la incorporación de átomos de fluor en su molécula .....	21
3. Clasificación de las quinolonas en función de su actividad microbiológica y de su farmacocinética .....	21
4. Actividad antibacteriana de las quinolonas (Lorenzo y Aleixandre, 2008).....	39
5. Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIM <sub>90</sub> en µg/ml) para algunos microorganismos sensibles al enrofloxacino (Otero <i>et al.</i> , 2001a).....	40
6. Variación en cantidad, emplazamiento y número de orificios por pezón en la glándula mamaria de algunas especies animales comunes (Larson, 1985) .....	91
7. Condiciones iniciales de calibrado (patrones de enrofloxacino en fase móvil).....	126
8. Exactitud y reproductibilidad del método de cuantificación .....	128
9. Porcentaje de recuperación del enrofloxacino tras el proceso de extracción en muestras de solución Tyrode .....	131
<b>9 (continuación).</b> Porcentaje de recuperación del enrofloxacino tras el proceso de extracción en muestras de solución Tyrode .....	132
10. Porcentaje de recuperación del enrofloxacino tras el proceso de extracción en muestras de tejido mamario .....	133
<b>10 continuación).</b> Porcentaje de recuperación del enrofloxacino tras el proceso de extracción en muestras de tejido mamario.....	134
11. Porcentaje de recuperación del enrofloxacino tras el proceso de extracción en muestras de leche .....	135
<b>11 (continuación).</b> Porcentaje de recuperación del enrofloxacino tras el proceso de extracción en muestras de leche.....	136
12. Porcentaje de recuperación de enrofloxacino tras el proceso de extracción en muestras de plasma .....	137
<b>12 (continuación).</b> Porcentaje de recuperación de enrofloxacino tras el proceso de extracción en muestras de plasma.....	138
13. Concentraciones de glucosa (mg/dl) en solución Tyrode. ....	149
14. Concentraciones de lactato (mmol/l) en solución Tyrode. ....	151
15. pH de la solución Tyrode.....	154

## Tabla

16. Presiones de perfusión y temperatura de la solución Tyrode. ....	157
17. Concentraciones de enrofloxacin (µg/ml) en solución Tyrode obtenidas tras la administración <i>sistémica</i> de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida.....	161
18. Parámetros farmacocinéticos no compartimentales de enrofloxacin tras la administración <i>sistémica</i> de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida.....	168
19. Parámetros farmacocinéticos compartimentales de enrofloxacin tras la administración <i>sistémica</i> de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida.....	169
20. Parámetros farmacocinéticos obtenidos por diversos autores tras la administración intravenosa de enrofloxacin en distintas especies animales .....	170
<b>20 (continuación)</b> . Parámetros farmacocinéticos obtenidos por diversos autores tras la administración intravenosa de enrofloxacin en distintas especies animales .....	171
21. Parámetros farmacocinéticos obtenidos por diversos autores tras la administración intramuscular de enrofloxacin en distintas especies animales.....	175
<b>21 (continuación)</b> . Parámetros farmacocinéticos obtenidos por diversos autores tras la administración intramuscular de enrofloxacin en distintas especies animales.....	176
22. Parámetros farmacocinéticos obtenidos por diversos autores tras la administración subcutánea de enrofloxacin en distintas especies animales .....	177
23. Parámetros farmacocinéticos obtenidos por diversos autores tras la administración oral de enrofloxacin en distintas especies animales.....	178
<b>23 (continuación)</b> . Parámetros farmacocinéticos obtenidos por diversos autores tras la administración oral de enrofloxacin en distintas especies animales.....	179
24. Concentraciones de enrofloxacin (µg/g) en tejido mamario perfundido a las distintas alturas de muestreo obtenidas tras la administración <i>sistémica</i> de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida .....	183
25. Concentraciones de enrofloxacin (µg/g) en tejido mamario contralateral no perfundido a las distintas alturas de muestreo obtenidas tras la administración <i>sistémica</i> de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida .....	183
26. Concentraciones de enrofloxacin (µg/g) en <i>pseudo-leche</i> obtenidas tras la administración <i>sistémica</i> de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida.....	188
27. Concentraciones de enrofloxacin (µg/ml) en solución Tyrode obtenidas tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacin (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida. ....	190

## Tabla

<b>28.</b> Concentraciones de enrofloxacin (µg/g) en tejido mamario perfundido a las distintas alturas de muestreo obtenidas tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacin (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida.....	199
<b>29.</b> Concentraciones de enrofloxacin (µg/g) en tejido mamario contralateral no perfundido a las distintas alturas de muestreo obtenidas tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacin (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida .....	200
<b>30.</b> Concentraciones plasmáticas de enrofloxacin (µg/ml) obtenidas tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacin (5 g de pomada al 20% (m/m)) ....	207
<b>31.</b> Concentraciones de enrofloxacin (µg/g) en tejido mamario obtenidas tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacin (5 g de pomada al 20% (m/m)) ....	213
<b>32.</b> Eficacia antibacteriana del enrofloxacin en solución Tyrode tras la administración <i>sistémica</i> de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida.....	224
<b>33.</b> Eficacia antibacteriana del enrofloxacin en solución Tyrode tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacin (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida.....	227
<b>34.</b> Concentración media de enrofloxacin en tejido mamario perfundido a las distintas alturas de muestreo, tras la administración <i>sistémica</i> de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida (n=12) .....	229
<b>35.</b> Concentración media de enrofloxacin en tejido mamario contralateral no perfundido a las distintas alturas de muestreo, tras la administración <i>sistémica</i> de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida (n=12) .....	231
<b>36.</b> Concentración media de enrofloxacin en tejido mamario perfundido a las distintas alturas de muestreo, tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacin (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida (n=14).....	233
<b>37.</b> Concentración media de enrofloxacin en tejido mamario contralateral no perfundido a las distintas alturas de muestreo, tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacin (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida (n=14).....	237
<b>38.</b> Eficacia antibacteriana del enrofloxacin en <i>pseudo-leche</i> tras la administración <i>sistémica</i> de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida (180 min de perfusión).....	238

Tabla

<b>39.</b> Eficacia antibacteriana del enrofloxacinó en plasma tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacinó (5 g de pomada al 20% (m/m)) en animales vivos. ....	239
<b>40.</b> Concentración de enrofloxacinó en tejido mamario a las distintas alturas de muestreo tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacinó (5 g de pomada al 20% (m/m)) en animales vivos (n=6). ....	241

***INTRODUCCIÓN***  
***(Objetivos)***



Desde su aparición, en los años 80, el enrofloxacino es una de las fluoroquinolona más utilizadas en Medicina Veterinaria (Otero *et al.*, 2001a).

Se caracteriza por tener una muy buena actividad antibacteriana incluso contra microorganismos poco susceptibles o resistentes a los antibacterianos de uso corriente en animales. Muestra un excelente comportamiento farmacocinético, con una absorción casi completa y una distribución tisular que garantiza concentraciones inhibitorias mínimas frente a los microorganismos patógenos causantes de la mayoría de las enfermedades en los animales, incluidas entre ellas las mastitis. Su índice terapéutico es alto, y puede administrarse sin mayores problemas en terapias combinadas con otros medicamentos. Estas propiedades hacen que este fármaco sea una excelente alternativa dentro del arsenal de quimioterápicos disponible en Medicina Veterinaria.

En el tratamiento de las mastitis la administración parenteral de antibacterianos es adecuada para aquellos fármacos que se excretan por la leche y alcanzan una concentración superior a la mínima inhibitoria de los microorganismos patógenos causantes del proceso. La vía intramamaria, sin embargo, sigue siendo la de elección por la mayoría de los autores.

Cuando se administra un fármaco antibacteriano por vía intramamaria, la absorción del mismo y su distribución por la ubre dependen de su liposolubilidad, del grado de ionización y de su afinidad por el tejido local (Ziv, 1980). Por otra parte, también juega un papel importante el vehículo en que se administra (Gruet *et al.*, 2001).

Señalar que, a la hora de desarrollar la formulación de un fármaco para el tratamiento de las mastitis, además de tener en cuenta las características farmacocinéticas del compuesto, debería prestarse atención también a los aspectos farmacodinámicos relacionados con la interacción entre el fármaco y los microorganismos implicados en el proceso, que servirían de base para determinar la dosis óptima del antibacteriano.

La administración intramamaria de los fármacos antibacterianos tiene la ventaja, frente a la vía parenteral, de que se alcanzan mayores concentraciones del fármaco en la glándula mamaria (Moretain y Boisseau, 1989; Gruet *et al.*, 2001). Entre las desventajas se podría citar la distribución irregular de muchas sustancias por el tejido mamario, el riesgo de contaminación cuando se introduce el fármaco por el canal del pezón y la posible irritación que puede producir el fármaco en el tejido (Pyörälä, 2002).

La biodisponibilidad local de un antibacteriano administrado por vía intramamaria se establece, por razones éticas, económicas y prácticas mediante el muestreo de leche y sangre. La concentración del fármaco en el tejido mamario, sin embargo, no se puede establecer a partir de estos resultados, y por ello, cobran importancia los modelos *in vitro* que permiten conocer la distribución local en la glándula mamaria y completar así los estudios farmacocinéticos.

Al respecto, se ha desarrollado y puesto a punto una técnica (Ehinger y Kietzmann, 2000a y b; Ehinger *et al.*, 2006) que permite estudiar la distribución de los fármacos en ubres de vaca aisladas y perfundidas.

Teniendo en cuenta las consideraciones hechas anteriormente, con la realización de este estudio pretendemos alcanzar los siguientes objetivos:

- Desarrollar un modelo *in vitro* de ubre ovina perfundida, que nos permita estudiar la distribución tisular de enrofloxacino en el tejido mamario, tras la administración, tanto intramamaria como *sistémica*.
- Validar el modelo *in vitro* como indicador de distribución.
- Determinar las concentraciones de enrofloxacino en el líquido de perfusión y en las biopsias recogidas del tejido mamario, tras la administración intramamaria de una nueva formulación de enrofloxacino.
- Realizar un estudio farmacocinético del enrofloxacino, estableciendo el modelo farmacocinético seguido por este compuesto tras la administración *sistémica* en el modelo *in vitro* de ubre ovina perfundida y determinar los parámetros farmacocinéticos más representativos de dicho compuesto.



***REVISIÓN  
BIBLIOGRÁFICA***



## 1. HISTORIA Y ORIGEN

Las quinolonas son un grupo de agentes antimicrobianos de origen sintético. El primer miembro de este grupo apareció en 1962, el ácido nalidíxico, que se obtuvo por síntesis a partir de la cloroquina (ácido 6-clor-1-H-4-oxoquinolina-3-carboxílico) en los laboratorios Sterling-Winthrop (Lesher *et al.*, 1962) y se introdujo ese mismo año como quimioterápico sintético. El ácido nalidíxico presentaba una modesta actividad frente a microorganismos Gram negativos, y algunas limitaciones en cuanto a sus parámetros farmacodinámicos y farmacocinéticos, sin embargo su aparición marcó el inicio del desarrollo de las quinolonas.

La importancia del ácido nalidíxico ha ido aumentando de forma paralela al descubrimiento de nuevos compuestos, como son los ácidos oxolínico, piromídico, cinoxacino y pipemídico. Estos compuestos fueron introducidos durante la década de los 60, desde entonces se han investigado y sintetizado gran número de quinolonas siempre buscando ampliar su espectro de acción, incrementar su actividad y cómo no, reducir los efectos no deseados. Las quinolonas tienen capacidad para inhibir la actividad de la ADN-girasa bacteriana, un tipo de topoisomerasa II encargada de mantener la conformación del ADN bacteriano y también necesaria para la transcripción y replicación del mismo, resultando en un efecto bactericida (Carlucci, 1998; Stratton, 1998; Orden y De La Fuente, 2001).

En la actualidad, las quinolonas originales son poco utilizadas debido al desarrollo de resistencias y a su toxicidad, especialmente para el sistema nervioso central (Stratton, 1998). La adición de un átomo de fluor en posición 6 y un anillo

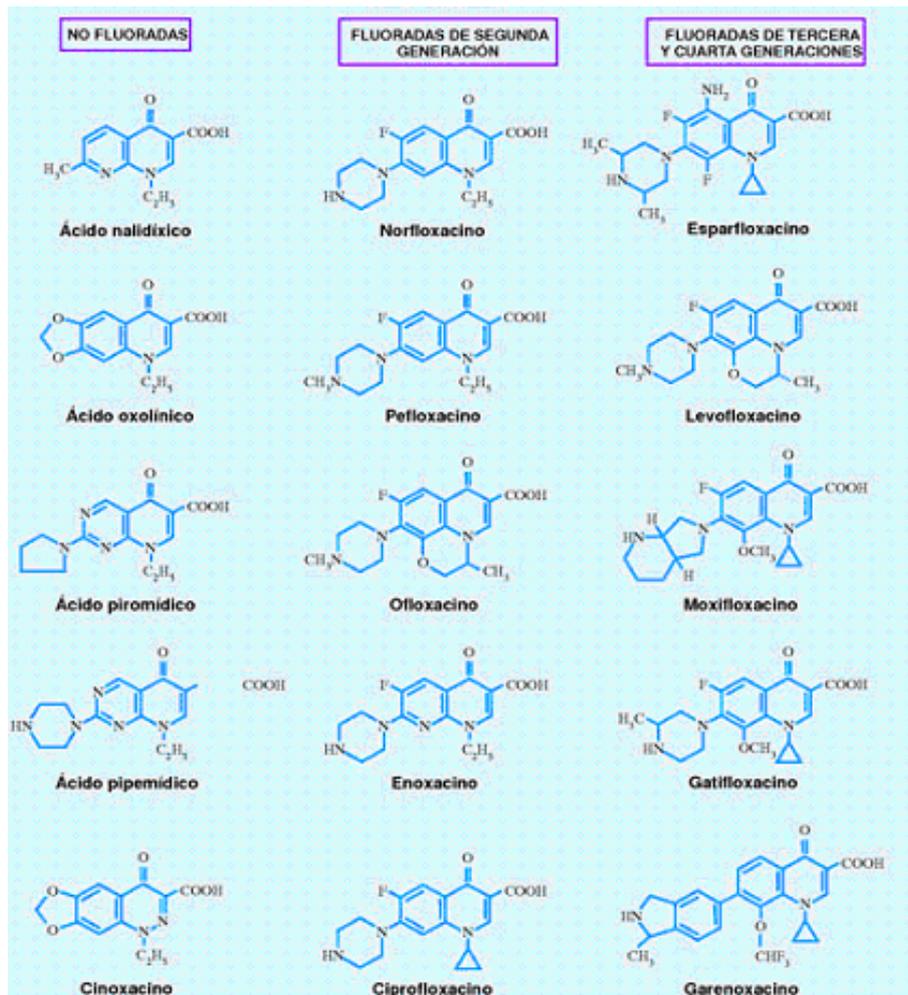
4-metilo-piperazin-1-il en posición 7, incrementó drásticamente la potencia y el espectro de actividad de estos inhibidores de la ADN-girasa, dando lugar a un nuevo grupo de antimicrobianos: las fluoroquinolonas (Carlucci, 1998; Orden y De La Fuente, 2001).

En 1973 apareció la primera quinolona con un átomo de flúor: la denominada flumequina, esta quinolona es unas diez veces más activa en comparación con el ácido nalidíxico frente a bacterias Gram negativas y además ya presentaba cierta actividad frente a bacterias Gram positivas (Rohlfing *et al.*, 1976; Appelbaum y Hunter, 2000; Emmerson y Jones, 2003).

Es en 1978 cuando se inicia la era de las quinolonas fluoradas con la síntesis del norfloxacino a partir del ácido pipemídico (del que sólo se diferencia por el átomo de fluor). Poco después se desarrollaron otras fluoroquinolonas similares (pefloxacino, ofloxacino, enoxacino, ciprofloxacino y amifloxacino). Estos compuestos constituyen la segunda generación de quinolonas, con unas características cinéticas y un perfil antimicrobiano muy favorable. Sin embargo, son poco eficaces frente a cocos Gram positivos aerobios y bacterias anaerobias. Posteriormente, se sintetizaron derivados quinolónicos fluorados que se consideran en la actualidad como quinolonas de tercera generación. Dentro de ellas hay compuestos difluorados (difloxacino, lomefloxacino y esparfloxacino) y trifluorados (fleroxacino, temafloxacino y tosufloxacino), que presentan ventajas respecto a la generación anterior, tanto con respecto a su espectro de acción como a su semivida. Dentro de la tercera generación se incluyen también otros compuestos modernos (gatifloxacino, moxifloxacino, trovafloxacino y clinafloxacino), que se caracterizan por tener una gran actividad frente a cocos Gram positivos así como frente a algunos patógenos intracelulares, manteniendo la actividad frente a Gram negativos (figura 1) (Bauernfeind, 1997; Lorenzo y Aleixandre, 2008).

Recientemente, y gracias al mayor conocimiento que se tiene de la relación estructura-actividad de las quinolonas, se ha desarrollado un nuevo grupo que se caracteriza por la ausencia del átomo de fluor en posición 6, característico de las fluoroquinolonas. Estas nuevas moléculas son conocidas con el nombre de desfluoroquinolonas o quinolonas no fluoradas (QNF), siendo el garenoxacino

(1-ciclopropil-8-difluorometoxi-7-((1R)-(1metil-2,3-dihidro-1H-5isoidolil)-4-oxo-1,4 dihidro-3-carboxi-quinolona) el primer representante del grupo. El garenoxacino presenta un amplio espectro de acción y una buena actividad frente a bacterias Gram positiva, Gram negativas y anaerobios.



**Figura 1.** Estructura química de las principales quinolonas no fluoradas, fluoradas de segunda generación y fluoradas más modernas.

En la actualidad, existen nuevas fluoroquinolonas, como la molécula WCK771 (Appelbaum *et al.*, 2005), la DK-507k (Browne *et al.*, 2003) o la ABT-492 (Nilius *et al.*, 2003). También se han descrito otras nuevas quinolonas, que como el

clinafloxacino presentan un átomo de Cloro en su estructura (Gargallo-Viola *et al.*, 2001). Tanto estas últimas como las anteriores pretenden mejorar la actividad frente a patógenos Gram positivos, especialmente frente a neumococos y estafilococos.

Debido al aumento de bacterias multiresistentes, se está desarrollando un nuevo grupo de antimicrobianos: los antibacterianos híbridos. Con estos antibacterianos híbridos se evita el buscar moléculas originales para el diseño de nuevos antibacterianos, ya que se unen dos núcleos de dos moléculas antibacterianas en una sola y de esta manera se puede actuar sobre dos dianas distintas simultáneamente y se ofrece la posibilidad de reducir la aparición de resistencias. Esta idea apareció por primera vez en 1994 al unir una molécula de quinolona con una sulfonamida, sin embargo en este caso la molécula híbrida no retuvo la actividad como sulfonamida (Allemandi *et al.*, 1994; Hubschwerlen *et al.*, 2003). A partir de este primer intento se han diseñado y sintetizado moléculas híbridas, uniendo quinolonas con oxazolidinonas. En este caso las moléculas sí que mostraron una doble actividad, actuando sobre las mismas dianas que actuarían las moléculas de quinolona u oxazolidinona por separado. Estos híbridos muestran una gran actividad frente a la gran mayoría de bacterias, incluyendo estafilococos multiresistente, enterococos resistentes a vancomicina, estreptococos y Gram negativas.

Las fluoroquinolonas que podemos encontrar actualmente en el mercado veterinario europeo incluyen: el amifloxacino, ciprofloxacino, difloxacino, danofloxacino, enrofloxacino, marbofloxacino, norfloxacino, orbifloxacino y sarafloxacino (Brown, 1996). Este grupo es ampliamente utilizado en caninos, felinos, bovinos, ovinos, equinos, porcinos y aves.

Las fluoroquinolonas tienen un mecanismo de acción único, que las convierte en uno de los grupos de antibacterianos más interesantes en Medicina Veterinaria. Su actividad bactericida de amplio espectro y su versatilidad, particularidades que permiten su utilización en diversas especies animales, han dado lugar a una gran difusión de su uso. A pesar de que se trata de un grupo de fármacos a los que las bacterias no desarrollan resistencias con facilidad, si se han detectado cepas resistentes tanto en pacientes humanos como en animales. Esto implica que se deba

proceder con mucho cuidado en su uso para evitar un aumento en la tasa de resistencia y la aparición de serios problemas de Salud Pública.

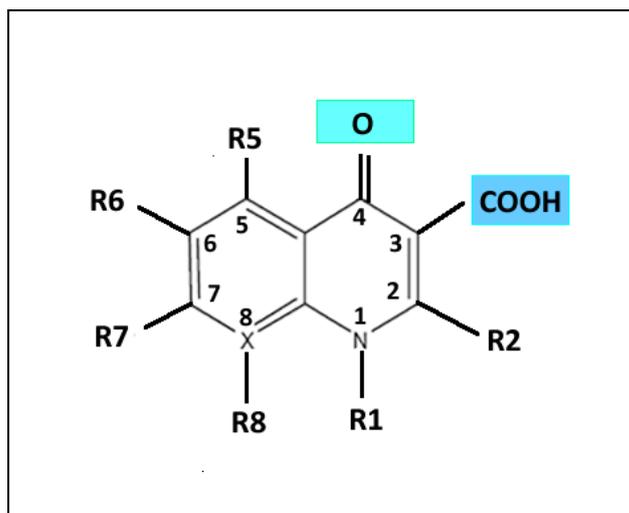
El enrofloxacinó es una fluoroquinolona desarrollada en los años 80 para su uso exclusivo en Medicina Veterinaria (Otero *et al.*, 2001a).

El enrofloxacinó se caracteriza por una muy buena actividad antimicrobiana, incluso contra microorganismos poco susceptibles o resistentes a los antimicrobianos de uso corriente en animales. Tiene un excelente comportamiento farmacocinético, con fácil administración, absorción casi completa y una distribución tisular que garantiza concentraciones inhibitorias mínimas frente a los microorganismos causantes de la mayoría de las enfermedades en los animales. Su índice terapéutico es alto, y puede administrarse sin mayores problemas en terapias combinadas con otros medicamentos. Estas propiedades hacen que este fármaco sea una excelente alternativa dentro del arsenal de quimioterápicos disponible en Medicina Veterinaria.

## 2. ESTRUCTURA DE LAS QUINOLONAS

### 2.1. ESTRUCTURA BÁSICA

Todas las quinolonas comparten una estructura básica común, es decir, un mismo núcleo (figura 2).



**Figura 2.** Estructura básica o núcleo común de las quinolonas.

Desde el punto de vista químico todas las quinolonas sintetizadas derivan de cuatro grupos: 4-oxo-cinolinas (4-cinolonas), 4-oxo-piridopirimidinas (4-pirimidonas), 4-oxo-quinolonas (4-quinolonas) y 4-oxo-naftiridinas (4-naftiridonas). De todas ellas, solo las 4-quinolonas y las 4-naftiridonas han sido ampliamente desarrolladas, ya que la presencia de un nitrógeno en posición 2 para las 4- cinolonas y en posición 6 para las 4-pirimidonas, reduce considerablemente la actividad de dichas moléculas (Gutierrez-Zufiaurre, 2004).

El desarrollo de las quinolonas se ha visto favorecido, en gran medida, por dos circunstancias: por la posibilidad de modificar su estructura básica y por la posibilidad de alterar seis radicales, es decir, todas las posiciones de la molécula,

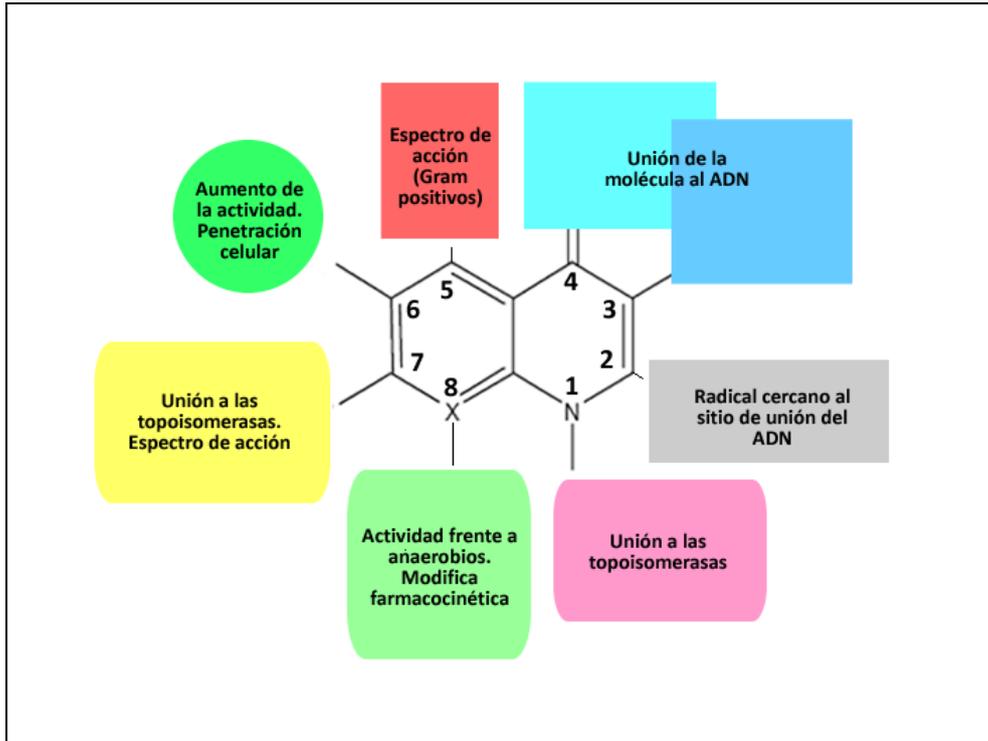
excepto 2: la posición 3 que presenta un radical carboxilo y la posición 4 que presenta un radical ceto.

Nos encontramos, por lo tanto, con un gran abanico de posibilidades para modificar y alterar el núcleo básico, dando lugar a variaciones en la actividad de las quinolonas frente a los microorganismos y a modificaciones en los parámetros farmacocinéticos. Por otra parte, también se puede ver alterada la toxicidad de la molécula así como las interacciones con otros fármacos.

Como consecuencia de todo ello y por su fácil síntesis se han desarrollado hasta nuestros días más de 10.000 moléculas (Andersson y MacGowan, 2003), aunque la gran mayoría no se utilizan en la práctica clínica, ya sea por problemas de toxicidad o porque no aportan ventajas sustanciales respecto a las quinolonas ya existentes.

## **2.2. RELACIÓN ESTRUCTURA - ACTIVIDAD**

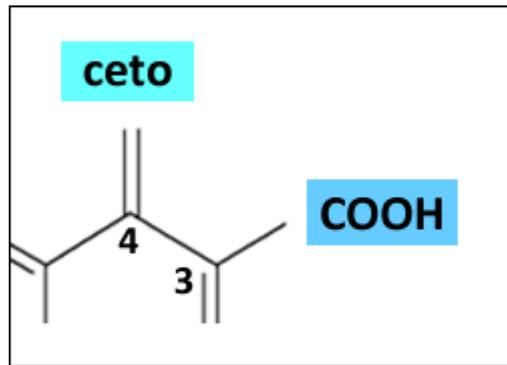
La actividad antibacteriana de la molécula depende no solo de que posea el núcleo intacto, sino también de la naturaleza de los radicales (figura 2) y de su relación espacial. Estos sustituyentes ejercen influencia sobre algunos parámetros, como la actividad antibacteriana de la molécula, incrementando su afinidad por las enzimas diana, favoreciendo la penetración de las quinolonas al interior celular o alterando los parámetros farmacocinéticos. En la figura 3, se muestra un resumen de la relación entre los distintos radicales y las propiedades que pueden modificar.



**Figura 3.** Relación estructura actividad.

A continuación, hablaremos brevemente de los distintos radicales que pueden ocupar las diferentes posiciones dentro de la estructura básica, y como esto afecta a la actividad y espectro de acción de la molécula resultante.

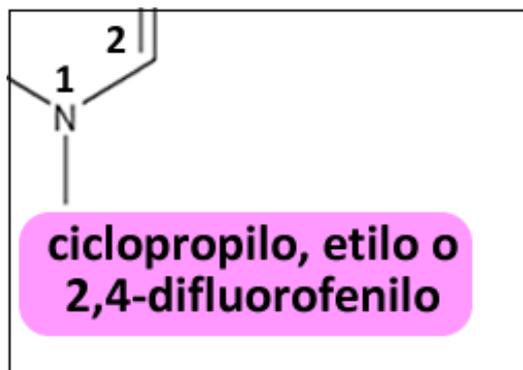
El grupo ceto en **posición 4** y el grupo carboxilo en **posición 3** son necesarios para que la molécula presente actividad antibacteriana, ya que son parte importante del complejo quinolona-enzima-ADN. Su función es la de unirse al ADN, de manera que fijan el complejo e impiden que las topoisomerasas ejerzan su acción (figura 4) (Chu y Fernandez, 1989; Higgins *et al.*, 2003).



**Figura 4.** Posición 3 y 4.

De la **posición 2** no existe mucha información sobre cuál es su papel, ya que no se han realizado muchos cambios a este nivel. Se cree que el radical que ocupa esta posición es pequeño porque se sitúa muy cerca del sitio de unión con el ADN y un radical de gran tamaño dificultaría esta unión. Este pequeño radical viene representado en la mayoría de las quinolonas por un hidrógeno.

Los radicales ubicados en la **posición 1** son responsables de la unión de la molécula de quinolona a la topoisomerasa. Este radical va a tener por lo tanto un papel importante en la actividad del fármaco. Además, dependiendo del tipo de radical, el espectro de acción y la farmacocinética del fármaco se verán modificados. En esta posición encontramos básicamente tres radicales distintos, siendo un grupo etilo, el de las primeras quinolonas (ácido nalidíxico o norfloxacin). Sin embargo, para mejorar la actividad frente a patógenos tanto Gram positivos como Gram negativos, este radical ha sido sustituido por un grupo ciclopropilo (como ocurre en el caso del enrofloxacin y del ciprofloxacino). Asimismo también aumenta la potencia de la molécula al sustituirlo por el 2,4-difluorofenilo, que aumenta sobre todo la actividad frente a bacterias Gram positivas (figura 5) (Chu y Fernandez, 1989; Gutierrez-Zufiaurre, 2004).

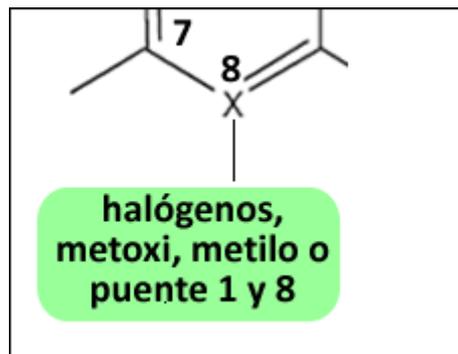


**Figura 5.** Posición 1.

Las sustituciones en **posición 8** van a dar lugar a cambios en la estructura tridimensional de las moléculas (Gutierrez-Zufiaurre, 2004), que modifican los parámetros farmacocinéticos y aumentan la actividad frente a anaerobios. Además, este radical se ha relacionado con la mutagenicidad de la molécula.

Existen quinolonas que no permiten ningún cambio en esta posición, como ocurre con las 4-naftiridonas, en cambio las 4-quinolonas sí permiten modificar este radical. Podemos encontrarnos en esta posición un radical halógeno (cloro o flúor) como en el caso del clinafloxacino o esparfloxacino, que mejora la actividad frente a anaerobios. También nos podemos encontrar un grupo metoxi (moxifloxacino) o metilo (gatifloxacino), que aumentan la actividad frente a anaerobios y bacterias Gram positivas. Otro radical que nos podemos encontrar es un puente entre los radicales 1 y 8, una benzoxacina, como ocurre en el caso del levofloxacino.

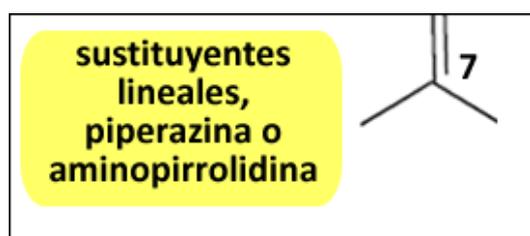
Parece existir una relación entre el tipo de radical presente en esta posición y la topoisomerasa que será diana principal de dicha quinolona, al menos en Gram positivos. Así pues, cuando el radical es un halógeno la diana principal es la ADN-girasa (topoisomerasa II), mientras que si es un simple hidrógeno o un puente entre las posiciones 1 y 8, la diana principal sería la topoisomerasa IV. Por otro lado, aquellas moléculas que presentan un grupo metoxi actuarían indistintamente sobre cualquiera de las dos topoisomerasas (figura 6) (Gutierrez-Zufiaurre, 2004; Peterson, 2001).



**Figura 6.** Posición 8.

Al igual que ocurre en la posición 1, las modificaciones en la **posición 7** también van a ser responsables de la unión de las quinolonas a las topoisomerasas, de la actividad y espectro de acción, y de la modificación de parámetros farmacocinéticos (vida media o solubilidad de las molécula) (Chu y Fernandez, 1989).

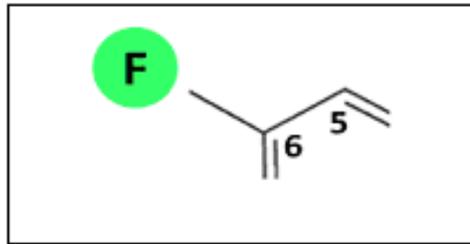
Las quinolonas con sustituyentes lineales o pequeños muestran poca actividad bactericida, mientras que la presencia de grupos heterocíclicos nitrogenados de 5 ó 6 átomos de carbono (aminopirrolidinas y piperazinas respectivamente) se corresponden con una mayor actividad frente a Gram positivos y Gram negativos (figura 7).



**Figura 7.** Posición 7.

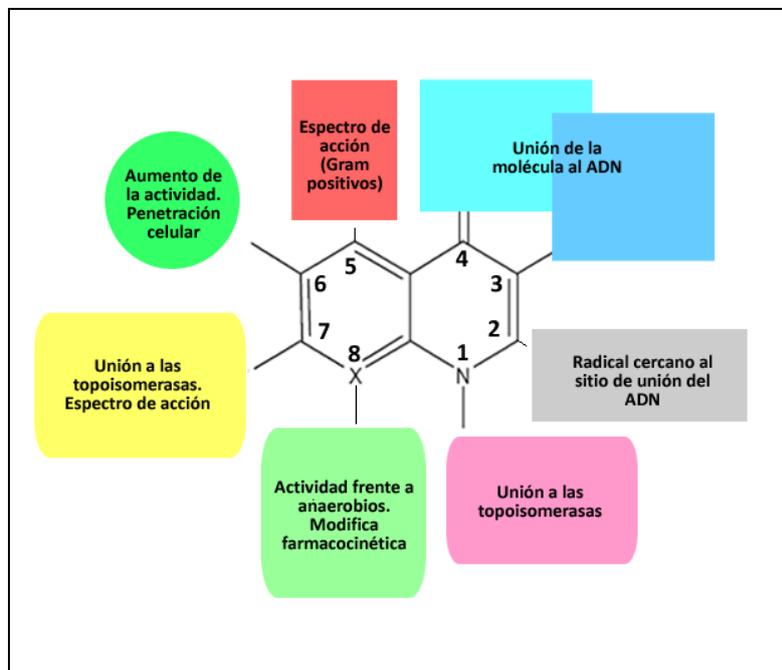
La adición de un grupo flúor en la **posición 6** mejora la actividad intrínseca de la molécula de 5 a 100 veces en comparación con aquellas que no lo poseen. Como hemos visto ya en apartados anteriores la adición de éste átomo de fluor dio lugar a las fluoroquinolonas. El átomo de fluor es responsable de una mayor

actividad de la molécula frente a Gram negativos y Gram positivos, así como, de su mayor potencia y penetración bacteriana (figura 8).



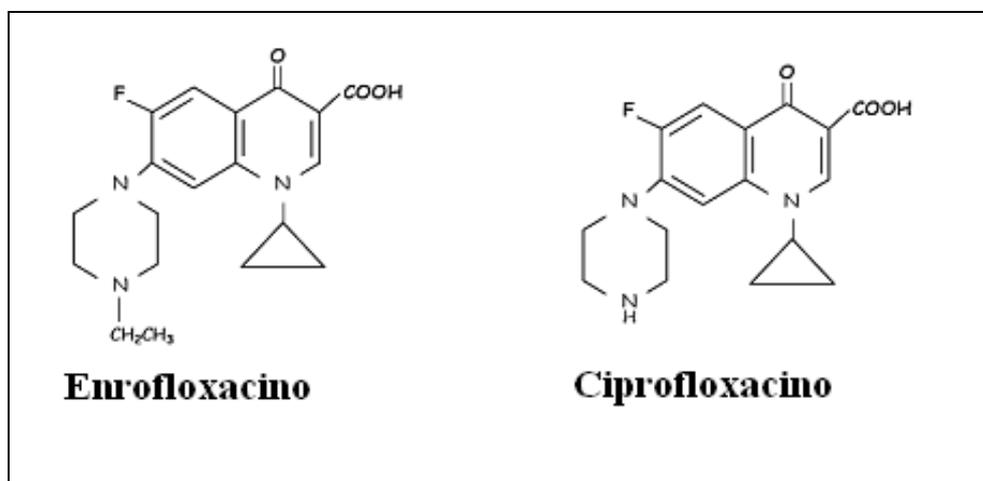
**Figura 8.** Posición 6.

**Posición 5.** Las sustituciones en esta posición pueden incrementar tanto la actividad de la molécula como el espectro de acción de la misma, Así, autores como Yoshida *et al.* (1990) demostraron que un grupo metilo en esta posición aumentaba la actividad frente a bacterias Gram positivas, pero no frente a las Gram negativas.



**Figura 10.** Estructura quinolónica común.

Como hemos mencionado anteriormente, el enrofloxacinó es una fluoroquinolona, que al metabolizarse da lugar a 8 metabolitos (ciprofloxacino, dioxociprofloxacino, oxociprofloxacino, ciprofloxacino N-formyl, enrofloxacinó amida, desethylene enrofloxacinó, oxoenrofloxacinó y oxoenrofloxacinó hidroxí), pero de todos ellos sólo el ciprofloxacino posee actividad antibacteriana, considerándose por lo tanto, el único metabolito activo. A continuación se detalla la estructura química del enrofloxacinó (objeto de estudio en este trabajo de Tesis doctoral) y del ciprofloxacino (figura 9). Cabe destacar, que en estas dos moléculas la posición 1 está ocupada por un grupo ciclopropilo, mejorando el espectro de actividad frente a las bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas. Poseen además, una piperazina en posición 7, mejorando la actividad frente a Gram negativas, incluyendo a las *Pseudomonas* spp. Finalmente, la sustitución en posición 8 de un nitrógeno por un átomo de carbono disminuye algunos de los efectos adversos sobre el sistema nervioso central y aumenta la actividad frente a *Staphylococcus* spp.



**Figura 9.** Estructura química del enrofloxacinó y de su metabolito, el ciprofloxacino.

### 2.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

Las fluoroquinolonas disponibles actualmente presentan pues una estructura quinolónica común (figura 10). Los distintos sustituyentes químicos y cadenas laterales son responsables no sólo del espectro de actividad antimicrobiano, sino como veremos a continuación también son responsables de las distintas características físicas de cada fármaco.

Así, nos encontramos que existen variaciones en cuanto a lipofilia, volumen de distribución (Vd), absorción oral y tasa de eliminación, sin embargo el espectro antimicrobiano no varía apreciablemente. Cuando la liposolubilidad se expresa como coeficiente de reparto octanol/agua, el enrofloxacino y el dofloxacino son los que presentan mayor lipofilia. El ciprofloxacino tiene un coeficiente de reparto que es aproximadamente 100 veces menor que el del enrofloxacino. Los coeficientes de reparto correspondientes al orbifloxacino y al marbofloxacino son ligeramente superiores al del ciprofloxacino (Takács-Novák *et al.*, 1992; Anne *et al.*, 1993).

Por el momento no existen estudios publicados que demuestren que las diferencias químicas entre estos fármacos sean responsables de diferencias en la respuesta clínica. Sin embargo, sí pueden ser la causa de una cierta variación en la absorción y distribución. Por ejemplo, la absorción oral del ciprofloxacino es aproximadamente la mitad de la absorción oral del enrofloxacino en perros. Las fluoroquinolonas menos liposolubles (marbofloxacino, orbifloxacino) poseen Vd menores que las más liposolubles (enrofloxacino, difloxacino). La explicación a esta observación podría ser que los fármacos más liposolubles presentan concentraciones intracelulares mayores, aunque una mayor unión a los tejidos también podría explicar las diferencias de Vd (Papich y Riviere, 2003).

Las quinolonas son moléculas anfóteras que pueden estar protonadas en el grupo carboxilo o en la amina terciaria de la molécula. El  $pK_a$  varía ligeramente de una molécula a otra. Así, en los fármacos de uso más frecuente, como son el enrofloxacino y el ciprofloxacino, el  $pK_a$  del grupo carboxilo es de 6,0 y 6,1 respectivamente, y de 8,8 y 7,8 para la amina, respectivamente. El punto isoeléctrico es intermedio entre el  $pK_a$  de cada grupo ionizable. Por ello, a pH fisiológico las

fluoroquinolonas se encuentran como zwitteriones, en los que están cargados tanto los correspondientes grupos aniónicos como catiónicos. En el punto isoeléctrico la lipofilia de las fluoroquinolonas es máxima (Takács-Novák *et al.*, 1992; Estribano *et al.*, 1997; Mitchell, 2006).

El enrofloxacinó es un sólido blanco ligeramente amarillento cuyas propiedades físicas se resumen, junto con las de su metabolito principal; el ciprofloxacino, en la siguiente tabla (tabla 1).

**Tabla 1.** Propiedades físicas del enrofloxacinó y el ciprofloxacino.

Enrofloxacinó	Ciprofloxacino
<b>Nombre químico:</b> Ácido 1-ciclopropil-7-(4-etil-1-piperazinil)-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-3-quinolincarboxílico.	<b>Nombre químico:</b> Ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolincarboxílico.
<b>Fórmula molecular:</b> C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	<b>Fórmula molecular:</b> C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>
<b>Peso molecular:</b> 359,4	<b>Peso molecular:</b> 331,34
<b>Solubilidad:</b> Ligeramente soluble en agua a pH 7. En medios ácidos puede precipitar. Levemente soluble en acetona y etanol.	<b>Solubilidad:</b> Poco soluble en agua; ligeramente soluble en ácido acético y metanol; muy ligeramente soluble en acetona, acetonitrilo, hexano, cloruro de metileno y alcohol deshidratado.
<b>Punto de ebullición:</b> 560°C	<b>Punto de ebullición:</b> 581°C
<b>Punto de fusión:</b> 219-221°C	<b>Punto de fusión:</b> 265°C
<b>pKa:</b> para el grupo carboxilo 6; para la amina 8,8	<b>pKa:</b> para el grupo carboxilo 6,1; para la amina 7,8

### **3. CLASIFICACIÓN DE LAS QUINOLONAS**

Las quinolonas se pueden clasificar atendiendo a su estructura química o en base a su actividad y farmacocinética. Otro método sencillo para clasificarlas es agruparlas por la fecha de aprobación para su uso clínico.

#### **3.1. CLASIFICACIÓN QUÍMICA**

Teniendo en cuenta la estructura del núcleo, nos encontramos con 4 clases distintas de quinolonas, 4-oxo-quinolinas (4-quinolonas), 4-oxo-naftiridinas (4-naftiridonas), 4-oxo-cinolinas (4-cinolonas) y 4-oxo-piridopirimidinas (4-pirimidonas). Dentro de cada grupo se pueden observar subgrupos en función de los átomos de fluor que presenta la molécula sin tener en cuenta la posición de éstos.

Como se puede comprobar en la tabla 2, el núcleo 4-quinolonas ha sido el más ampliamente modificado y en consecuencia el más estudiado. Dentro de este grupo, ha sido el subgrupo de quinolonas monofluoradas el que ha proporcionado un mayor número de moléculas (Lorenzo y Aleixandre, 2008).

#### **3.2. CLASIFICACIÓN POR GENERACIONES**

Agrupar las quinolonas por generaciones al igual que ocurre con los  $\beta$ -lactámicos, en función de los parámetros farmacocinéticos y el espectro de acción de la molécula. Dependiendo de los autores, una misma molécula puede pertenecer a una u otra generación, pero en lo que sí coinciden es en agruparlas en cuatro generaciones distintas (tabla 3). Esta clasificación no incluye a los híbridos entre quinolonas y oxazolidinona.

**Tabla 2.** Clasificación de las quinolonas atendiendo a su estructura química y a la incorporación de átomos de fluor en su molécula.

	4-piridonas	4-cinolonas	4-naftiridonas	4-quinolonas
<b>No Fluoradas</b>	Ac. pipedímico	Cinoxacino	Ac. nalidíxico	Ac. oxolínico PGE-9262932 PGE-9509924 PGE-4175997 T-3912
<b>Monofluoradas</b>			Enoxacino Cl-990 PD-131628 PD-138312	Flumequino Norfloxacino Pefloxacino Ciprofloxacino Enrofloxacino Ofloxacino Levofloxacino Moxifloxacino Climafloxacino Gatifloxacino Grepafloxacino WCK-771 E-4767 E-5065
<b>Bifluoradas</b>				Esparfloxacino Lomefloxacino Garenoxacino DK-507k
<b>Trifluoradas</b>			Tosufloxacino Trovafoxacino Temafoxacino	Fleroxacino ABT-492

**Tabla 3.** Clasificación de las quinolonas en función de su actividad microbiológica y de su farmacocinética.

Generación	Quinolona	Actividad microbiológica	Características farmacocinéticas	Indicaciones
<b>PRIMERA</b>	Ac. nalidíxico Ac. oxolínico Cinoxacino Ac. pipedímico	Enterobacteriáceas	Administración oral. Baja concentración en plasma y tejido.	Infecciones urinarias.
<b>SEGUNDA</b>	Lomefloxacino Enoxacino Norfloxacino  Ofloxacino Enrofloxacino Ciprofloxacino	Enterobacteriáceas   Enterobacteriáceas, patógenos atípicos, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Administración oral. Baja concentración en plasma y tejido.  Administración oral y endovenosa. Altas concentraciones en plasma y tejido.	Infecciones urinarias.   Infecciones sistémicas y urinarias.
<b>TERCERA</b>	Esparfloxacino Levofloxacino Gatifloxacino	Enterobacteriáceas, patógenos atípicos, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Administración oral y endovenosa. Altas concentraciones en plasma y tejido.	Infecciones sistémicas y urinarias.
<b>CUARTA</b>	Trovafoxacino Moxifloxacino Gemifloxacino Climafloxacino Sitafloxacino	Enterobacteriáceas, patógenos atípicos, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , patógenos respiratorios, anaerobios.	Administración oral y endovenosa. Altas concentraciones en plasma y tejido.	Infecciones sistémicas y urinarias. Infecciones respiratorias.

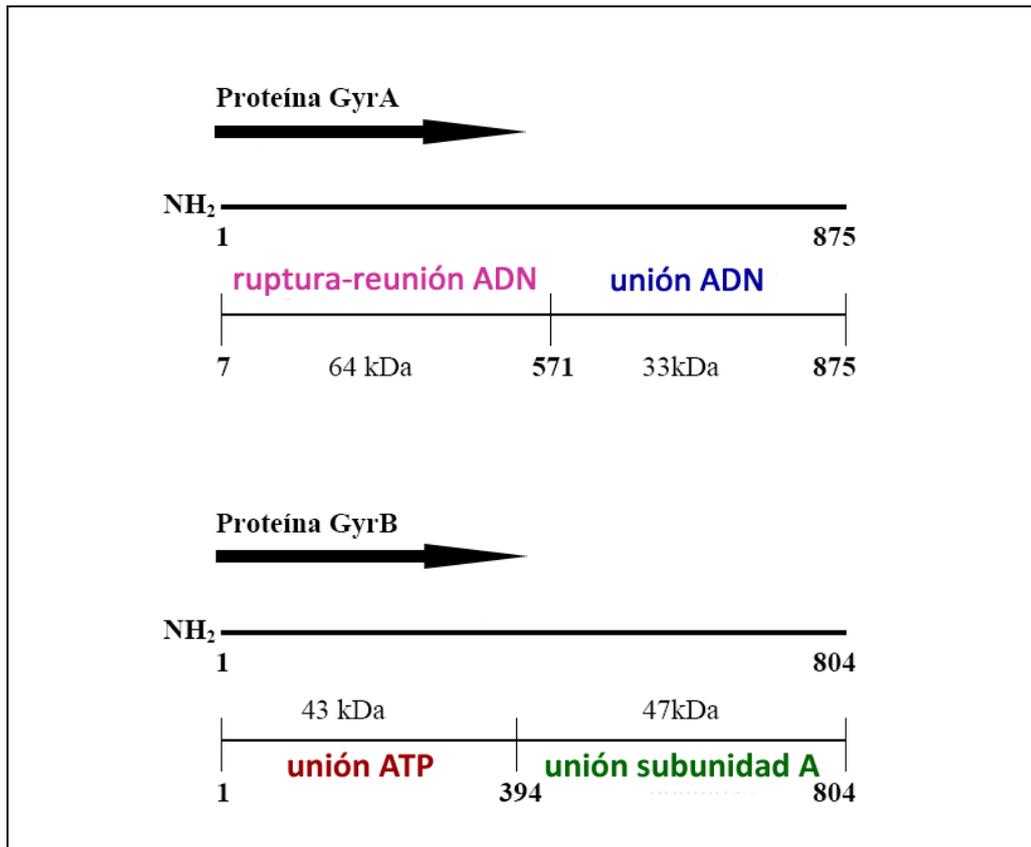
#### 4. MECANISMO DE ACCIÓN

Los antibacterianos de tipo quinolona penetran en el citoplasma bacteriano a través de los canales acuosos transmembrana de las porinas, o por difusión pasiva a través de la capa de los lipopolisacáridos (Nikaido y Thanassi, 1993), no afectándoles la integridad de la pared celular. Una vez dentro de la célula, actúan por mecanismos que son complejos y no del todo conocidos.

Aunque se conoce que las quinolonas están dotadas de acción bactericida, su mecanismo de acción, a pesar de los numerosos estudios realizados, no está totalmente esclarecido. Se cree que las quinolonas actúan inhibiendo la ADN-girasa. Esta enzima, descubierta en 1976 por Gellert *et al.* en *Escherichia coli* (Gellert *et al.*, 1976), está involucrada en la mayoría de los procesos biológicos que afectan al ADN, tales como la transcripción, recombinación, replicación y reparación del mismo, siendo a su vez, dependiente de ATP (Wolfson y Hooper, 1985; Reece y Maxwell, 1991; Lewis *et al.*, 1996). Por ello, a este grupo terapéutico se le conoce también con el nombre de *inhibidores* de la ADN- girasa.

A nivel molecular la ADN-girasa es un complejo tetramérico, compuesto por cuatro subunidades (dos subunidades A (GyrA) y dos subunidades B (GyrB) (figura 11) y es la responsable de introducir un superenrollamiento helicoidal negativo dentro de la molécula de ADN bacteriano, desempeñando por lo tanto un rol crítico en el mantenimiento de la densidad genómica superhelicoidal (figura 12).

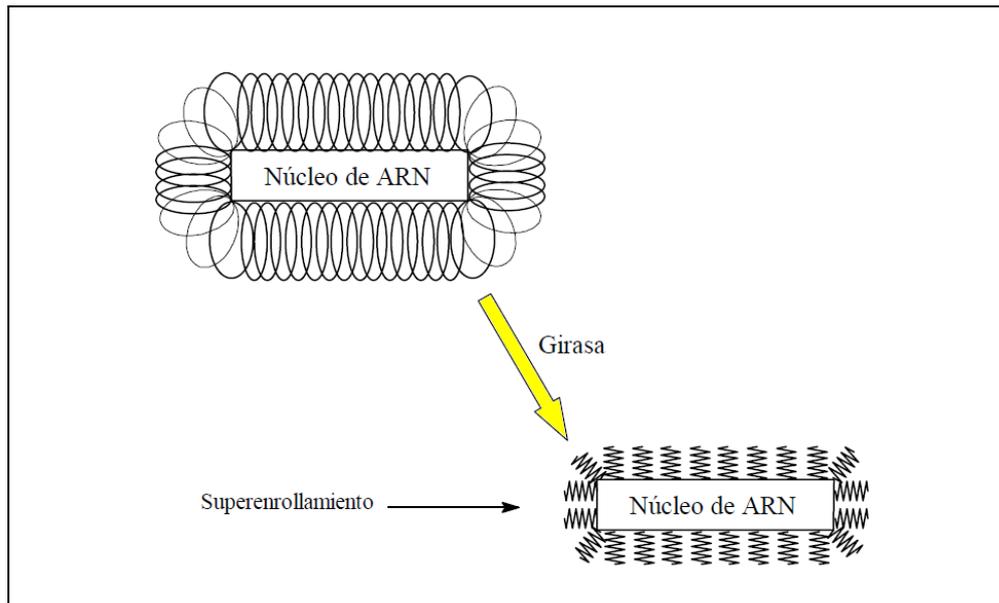
Las subunidades A desarrollan su actividad anclándose en ambas hebras del ADN (mediante la formación de un enlace covalente enzima-ADN), provocando cortes en sitios específicos del ADN de una sola banda y uniendo posteriormente estos puntos de ruptura. Las subunidades B, por su parte, inducen los superenrollamientos en torno al núcleo de ARN, se unen al ATP y participan en la transducción de la energía. (Higgins *et al.*, 1978; Mizuuchi *et al.*, 1978).



**Figura 11.** Representación esquemática de la estructura de las subunidades A y B de la ADN-girasa de *E. coli* (Fisher *et al.*, 1992).

Las quinolonas actúan sobre las subunidades A, impidiendo por lo tanto la reparación de los cortes que se producen en el ADN. Su acción se manifiesta macroscópicamente por una elongación anormal de las bacterias, ya que el ADN pierde la forma superenrollada y aumenta de volumen. La inhibición de la enzima ADN-girasa justifica la actividad bacteriostática, pero no la acción bactericida de las quinolonas clásicas. Para la muerte bacteriana, es necesario que sobre las roturas del ADN, realizadas por las quinolonas, actúen exonucleasas. Como veremos más adelante este tipo de mecanismo de acción se denomina mecanismo de acción A, y es común a todas las quinolonas.

Las quinolonas actúan, por lo tanto, interfiriendo en la síntesis del ADN al bloquear la reacción de superenrollamiento catalizada por la ADN-girasa.



**Figura 12.** Esquema de los sucesivos plegamientos del ADN por acción de la ADN-girasa (Smith, 1986).

Algunas quinolonas por su parte, pueden actuar inhibiendo a la topoisomerasa IV (enzima cuya secuencia de aminoácidos presenta homología con la ADN-girasa). Se trata de otra enzima esencial en la segregación cromosómica de las células procariotas (Marians y Hiasa, 1997; Anderson *et al.*, 1998). Ciertas investigaciones han sugerido que en los organismos Gram positivos (*Staphylococcus aureus*) es esta enzima la principal diana para algunas quinolonas (Brighty y Gootz, 1997; Drlica y Zhao, 1997), mientras que para muchas especies de bacterias Gram negativas, tales como *E. coli*, la diana principal es la ADN-girasa (Alovero *et al.*, 2000; Hooper, 2000; Petri, 2006). Considerando que la topoisomerasa IV tiene funciones algo distintas, es probable que las bacterias difieran en sus respuestas a las quinolonas en función de cuál sea su diana principal (Drlica y Zhao, 1997). Esto tiene mucha trascendencia puesto que estudios en *E. coli* han sugerido que la ADN-girasa actúa antes de la replicación de la horquilla, mientras que la topoisomerasa IV actúa predominantemente después, de forma que existe un intervalo de tiempo que permite reparar el daño en el ADN inducido por las quinolonas (Zechiedrich y Cozzarelli, 1995). De ello se deduce que los complejos fármaco-enzima-ADN a través de la

girasa proporcionaría una muerte rápida de la bacteria, mientras que a través de la topoisomerasa IV sería un proceso lento.

Se han descrito cuatro mecanismos de acción conocidos como: A, B, B<sub>1</sub> y C, que varían según la quinolona y el microorganismo considerado (Crumplin *et al.*, 1984; Ratcliffe y Smith, 1984; Ratcliffe y Smith, 1985; Lewis y Smith, 1988; Lewin *et al.*, 1989; Lewis y Smith, 1989; Lewin y Amyes, 1990).

El mecanismo A es, como hemos visto con anterioridad, común a todas las quinolonas y requiere que la bacteria esté multiplicándose y que presente síntesis de ARN y proteínas. Este mecanismo es el único que se manifiesta en las quinolonas clásicas, como es el caso del ácido nalidíxico y el ácido oxolínico (Dietz *et al.*, 1966; Winshell y Rosenkraz, 1970; Lewis y Smith, 1989). Las fluoroquinolonas, además del mecanismo A, pueden presentar el mecanismo B y el C. El mecanismo B no requiere que se produzca síntesis de proteínas o ARN en las bacterias para ejercer su efecto bactericida (Crumplin *et al.*, 1984; Ratcliffe y Smith, 1984). La existencia de este mecanismo, independiente de la síntesis de proteínas, se basa en que algunas quinolonas como el ciprofloxacino y el ofloxacino, administradas a dosis elevadas o en presencia de sustancias que inhiben la síntesis proteica o del ARN (rifampicina, cloranfenicol), e incluso en condiciones anaerobias, apenas alteran su efecto bactericida (Ratcliffe y Smith, 1984; Smith, 1986; Lewis *et al.*, 1991). Se ha identificado un mecanismo relacionado únicamente con el clinafloxacino. Este mecanismo, conocido como mecanismo B<sub>1</sub>, no precisa la síntesis de proteínas o ARN, pero necesita que la bacteria se esté multiplicando (Lewin y Amyes, 1990).

Por último, el mecanismo C requiere que haya síntesis de proteínas y ARN para actuar, pero no hace falta que la bacteria se esté multiplicando. Este mecanismo se ha observado en el norfloxacino (Ratcliffe y Smith, 1985) y enoxacino (Lewin *et al.*, 1989).

El hecho de que una fluoroquinolona presente un mecanismo de acción frente a una especie bacteriana no significa que lo presente frente a todas, puesto que éste depende de la quinolona y del microorganismo en cuestión. En el caso particular del ciprofloxacino, se ha observado que muestra los mecanismos A y B frente a *E. coli*,

pero solamente muestra un mecanismo A frente a *S. aureus* (Brighty y Gootz, 1997). Lo que sí está bastante aceptado es que la posesión de más de un mecanismo de acción puede explicar el hecho de que las fluoroquinolonas sean más potentes que las quinolonas clásicas, que sólo actúan a través del mecanismo A (Ramón *et al.*, 1999).

Las quinolonas muestran, además, un modo de acción peculiar, ya que en algunas cepas bacterianas estos fármacos, a elevadas concentraciones, muestran una incapacidad para matar a las células bacterianas de forma tan efectiva como lo hacen a concentraciones moderadas. De hecho, cuando se evalúa la actividad bacteriana de las quinolonas a diferentes concentraciones en un periodo de tiempo determinado, se ha observado, con relativa frecuencia, que la proporción de bacterias supervivientes sigue una respuesta bifásica. En la primera fase al aumentar la concentración del fármaco, aumenta su actividad bactericida hasta alcanzar un máximo a partir del cual, al incrementar la concentración se produce un descenso en la actividad bactericida, constituyendo éste proceso la segunda fase. A este hecho se le conoce como efecto paradójico y es uno de los mayores dilemas que existen sobre la actividad de las quinolonas (Crumplin y Smith, 1975). Este modo particular de acción se ha observado y estudiado en varias especies bacterianas (Crumplin y Smith, 1975; Lewis *et al.*, 1991) y en un gran número de quinolonas (Lewis y Smith, 1988; Cantón *et al.*, 1989; Lewin *et al.*, 1989, Lewis y Smith, 1989; Jiménez *et al.*, 1990; Lewin y Amyes, 1990).

En 1948, Eagle y Musselman, describieron este efecto en la penicilina y, posteriormente otros autores lo describieron en otros  $\beta$ -lactámicos y en los aminoglucósidos (Lorian *et al.*, 1979; Shah *et al.*, 1979), aunque siempre de forma aislada, como característica propia de especie o cepa.

En 1970, Winshell y Rosenkraz observaron este fenómeno en el ácido nalidíxico al actuar sobre *E. coli*. Años más tarde, en 1975, Crumplin y Smith, describieron también esta acción del ácido nalidíxico frente a varias cepas de *E. coli* y otras especies patógenas del tracto urinario y Enterobacterias, proponiendo que, para el ácido nalidíxico, el efecto paradójico no es específico de especie o cepa, sino un fenómeno característico de su modo de actuar. Posteriormente se ha descrito en diversas fluoroquinolonas, como el ciprofloxacino, el ofloxacino, el enoxacino, el

fleroxacino, el lomefloxacino y el norfloxacino entre otras (Smith, 1986; Cantón *et al.*, 1989; Lewin *et al.*, 1989; Jiménez *et al.*, 1990), lo que hace pensar que sea un efecto característico de las quinolonas en general.

Se han propuesto varias hipótesis para explicar este efecto paradójico. La más aceptada se basa en que a altas concentraciones de fármaco se produce la inhibición de la síntesis de ARN y de algunas proteínas (Manes *et al.*, 1983). Sin embargo, ésta no es una explicación satisfactoria para comprender el comportamiento de otras quinolonas como el ciprofloxacino, puesto que a altas concentraciones estos agentes matan la célula bacteriana de un modo que no se bloquea por la inhibición de la síntesis de proteínas (Chen *et al.*, 1996). De acuerdo con lo anteriormente mencionado, parece que la pérdida de letalidad a altas concentraciones de quinolonas permanece inexplicada.

Finalmente, no debemos olvidar que las topoisomerasas se encuentran también en organismos eucariotas, desde levaduras hasta en seres humanos. Las células eucariotas no contienen la ADN-girasa, sin embargo, contienen una topoisomerasa tipo II, similar desde el punto de vista conceptual y mecánico. La topoisomerasa II eucariota difiere estructuralmente de la bacteriana y, si bien hace cortes al ADN, no produce superenrollamiento negativo (Hooper, 1995; Lewis *et al.*, 1996). Aún así, se ha demostrado que esta topoisomerasa eucariota tiene una secuencia parcial de aminoácidos homóloga a la enzima topoisomerasa II bacteriana (ADN-girasa), que podría representar un sitio de acción para las quinolonas (Hooper, 1995). Se pensaba que las quinolonas eran incapaces de inducir daño genético en células de mamíferos, debido a la menor afinidad de las quinolonas por la topoisomerasa II eucariota y a la necesidad de utilizar concentraciones de fármaco muy elevadas (100 a 1000 µg/ml) (Petri, 2006). Sin embargo, ciertos estudios parecen evidenciar una posible genotoxicidad de las quinolonas sobre sistemas eucariotas (Takayama *et al.*, 1995; Gorla *et al.*, 1999).

## 5. RESISTENCIA BACTERIANA

El amplio espectro de actividad antimicrobiana, y el excelente comportamiento farmacocinético, han hecho de las nuevas fluoroquinolonas agentes muy atractivos para el tratamiento de enfermedades infecciosas severas, tanto en el hombre como en los animales. Sin embargo, se ha observado una alarmante tasa de resistencias bacterianas en aislados clínicos humanos, y hay evidencias que indican un aumento de bacterias resistentes en animales tratados. La mayor incidencia de bacterias resistentes a las fluoroquinolonas en personas no expuestas a estos agentes podría ser el resultado del uso extensivo de estos antimicrobianos en Medicina Veterinaria (Ziv, 1994).

Como hemos adelantado anteriormente, para ejercer su efecto citotóxico las quinolonas deben penetrar a través de la membrana bacteriana y alcanzar su diana celular; la ADN-girasa o la topoisomerasa IV, e inducir la muerte de la célula. Así, los mecanismos de resistencia bacteriana a las fluoroquinolonas, y a las quinolonas en general, pueden agruparse en tres categorías:

- 1) Resistencias de tipo cromosómico, producidas por mutaciones en los genes que codifican la ADN-girasa y la topoisomerasa IV, dando lugar a las QRDR (*región determinante de resistencia a las quinolonas*) (Wolfson y Hooper, 1989; Nakamura, 1997).
- 2) Resistencias por alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular externa, disminuyendo la penetración intracelular del fármaco. Estas modificaciones se originan por alteraciones de los genes que codifican los canales de las porinas, lo que impide la entrada del fármaco en la bacteria.
- 3) Resistencia basada en los mecanismos de expulsión activa, a través de transportadores activos endógenos que provocan la expulsión de los antimicrobianos desde el medio intracelular al medio extracelular.

Cabe señalar que no se han descrito enzimas bacterianas capaces de degradar o inactivar a las quinolonas en el medio intracelular (Wolfson y Hooper, 1989).

## 5.1. RESISTENCIA POR ALTERACIÓN DE LAS ENZIMAS DIANA

Este mecanismo constituye el principal mecanismo de resistencia a las fluoroquinolonas. La ADN-girasa de *E. coli* (bacteria en la cual se centraron los estudios iniciales) está compuesta de dos subunidades A de 97 kDa, y otras dos subunidades B de 90 kDa, codificadas por los genes *gyrA* (2625 pb) y *gyrB* (2413 pb) respectivamente (figura 11). La topoisomerasa IV también está compuesta de cuatro subunidades codificadas por los genes *parC* y *parE* en *E. coli* (*grlA* y *grlB* en *S. aureus*) (Drlica y Zhao, 1997; Hooper, 2000). Estas dos enzimas presentan una gran homología entre sí. El mecanismo de resistencia se origina en mutaciones espontáneas de los genes *gyrA* y *gyrB* de la ADN-girasa, y en los genes *parC* y *parE* de la topoisomerasa IV (Sierra *et al.*, 2005).

La mutación se produce principalmente sobre la ADN-girasa (Nakamura *et al.*, 1989; Yoshida *et al.*, 1990), y secundariamente sobre la topoisomerasa IV, contribuyendo a mayores niveles de resistencia (Vila *et al.*, 1996). Sustituciones en aminoácidos en un sub-dominio específico de las topoisomerasas, llamado *región determinante de resistencia a las quinolonas* (QRDR) dentro de la subunidad *gyrA* (Yoshida *et al.*, 1990) y *parC* (Khodursky *et al.*, 1998) dan lugar a resistencias bacterianas.

Como sabemos en *E. coli* y otras bacterias Gram negativas, como *Neisseria gonorrhoeae* y *Pseudomonas aeruginosa*, la principal diana de las quinolonas es la ADN-girasa. Por esta razón, en éstas bacterias las primeras resistencias se producen por mutaciones en la ADN-girasa, constituyendo las mutaciones en la topoisomerasa IV resistencias adicionales.

En el caso particular de *E. coli*, la mayoría de las mutaciones asociadas con la resistencia a quinolonas ocurren en la región QRDR a nivel de la serina 83 (Ser83) y aspartato 87 de la subunidad *gyrA*, y en la serina 79 y aspartato 83 de la subunidad *parC*, y en análogos lugares en otras especies (Takiff *et al.*, 1994; Taylor y Chau, 1997; Bebear *et al.*, 2003).

El análisis de las secuencias de ADN de los genes de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* spp. mostraron que esta situación es diferente en Gram positivos, ya

que el blanco de acción de las fluoroquinolonas es la topoisomerasa IV (Hooper, 1995; Drlica y Zhao, 1997).

Tanto en bacterias Gram negativas como en bacterias Gram positivas las mutaciones provocan una disminución en la afinidad de las quinolonas por el complejo enzima/ADN (Maxwell y Critchlow, 1998), y permiten la replicación del ADN en presencia de concentraciones de fármaco que serían bactericidas para microorganismos sin mutación.

En bacterias Gram negativas, la resistencia a quinolonas se desarrolla normalmente de forma gradual. Una única mutación en la región QRDR, generalmente en posición Ser83, confiere resistencia al ácido nalidíxico y disminuye la susceptibilidad a las fluoroquinolonas (las CMI's del ciprofloxacino pasan de 0.015-0.03 µg/ml a 0.125-1 µg/ml tras esta primera mutación). Si ocurre una segunda mutación en la región QRDR de la subunidad *gyrA*, la resistencia a las fluoroquinolonas es evidente (CMI's de la ciprofloxacina  $\geq 4$  µg/ml). Sin embargo esto no ocurre así en las bacterias Gram negativas. Se ha demostrado que en *Campylobacter* spp., bacterias que carecen de la topoisomerasa IV, una simple mutación en la subunidad *gyrA* es suficiente para alcanzar elevadas CMI's de ciprofloxacino (32 µg/ml) (Wang *et al.*, 1993). Esta característica ayuda a explicar la mayor prevalencia de resistencia en *Campylobacter* spp. que en *E. coli*, en animales de abasto expuestos a fluoroquinolonas (Van Boven *et al.*, 2003).

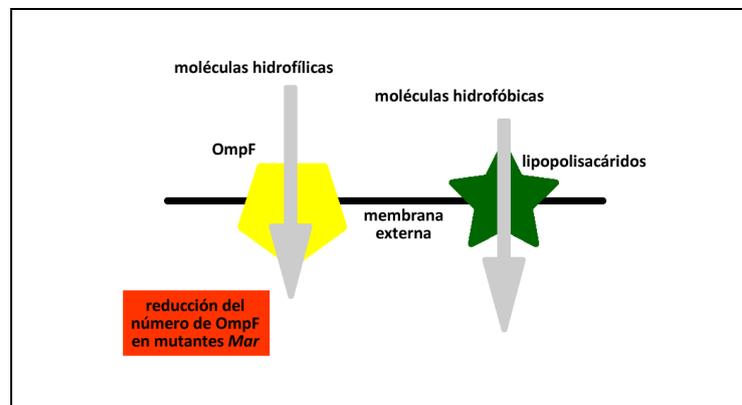
Finalmente señalar que las resistencias pueden deberse a mutaciones puntuales en uno o en varios genes, a mutaciones en más de un sitio del mismo gen, o a mutaciones múltiples, particularmente en *gyrA* y *parC* (*grlA*).

## **5.2. RESISTENCIA POR ALTERACIÓN DE LA PERMEABILIDAD BACTERIANA**

Además de las mutaciones estructurales en los genes de las topoisomerasas, en bacterias Gram negativas se ha descrito otro mecanismo de resistencia: resistencia por alteración de la permeabilidad de la membrana celular externa. El papel

fundamental que ejercen los canales de porinas en la difusión de las quinolonas hidrofílicas a través de la membrana externa de las bacterias Gram negativas quedó respaldado por la observación de que numerosos mutantes *Mar* (*multiple antibiotic resistant*) que mostraban resistencias a estos agentes tenían en común la reducción del número de OmpF, la principal y mayor proteína de las porinas de la membrana externa de *E. coli* (Cohen *et al.*, 1989). Ello sugiere que las quinolonas hidrofílicas deben entrar en la célula bacteriana, al menos en parte, a través del canal de la porina OmpF. Por otro lado, las moléculas hidrofóbicas parecen utilizar una ruta alternativa de difusión a través de lipopolisacáridos (Chapman y Georgopapadaku, 1988; Nikaido y Thanassi, 1993). Modificaciones a nivel de dichos lipopolisacáridos reducirá la penetración intracelular de las moléculas hidrofóbicas (figura 13).

Todo esto resulta en una menor acumulación intracelular del antimicrobiano, y en una consecuente disminución de la susceptibilidad microbiana (Brighty y Gootz, 1997).



**Figura 13.** Resistencia por alteración de la permeabilidad de la membrana celular externa.

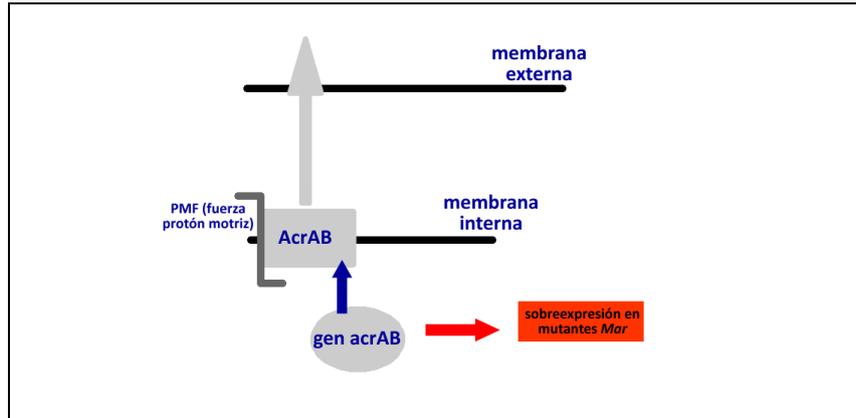
### 5.3. RESISTENCIA POR MECANISMOS DE EXPULSIÓN ACTIVA

Con respecto a este tercer mecanismo, la gran mayoría las especies bacterianas analizadas presentan sistemas de eflujo activo, caracterizados por

expulsar al exterior celular un considerable número de moléculas, como antibacterianos de distintas familias estructurales y en muchos casos antisépticos, biocidas, compuestos aromáticos y detergentes. Debemos señalar que una única célula bacteriana puede tener hasta 20 sistemas de eflujo distintos (Sanchez-Céspedes *et al.*, 2003). Este sistema fue descrito inicialmente en *E. coli*, y posteriormente en otras bacterias Gram negativas y Gram positivas.

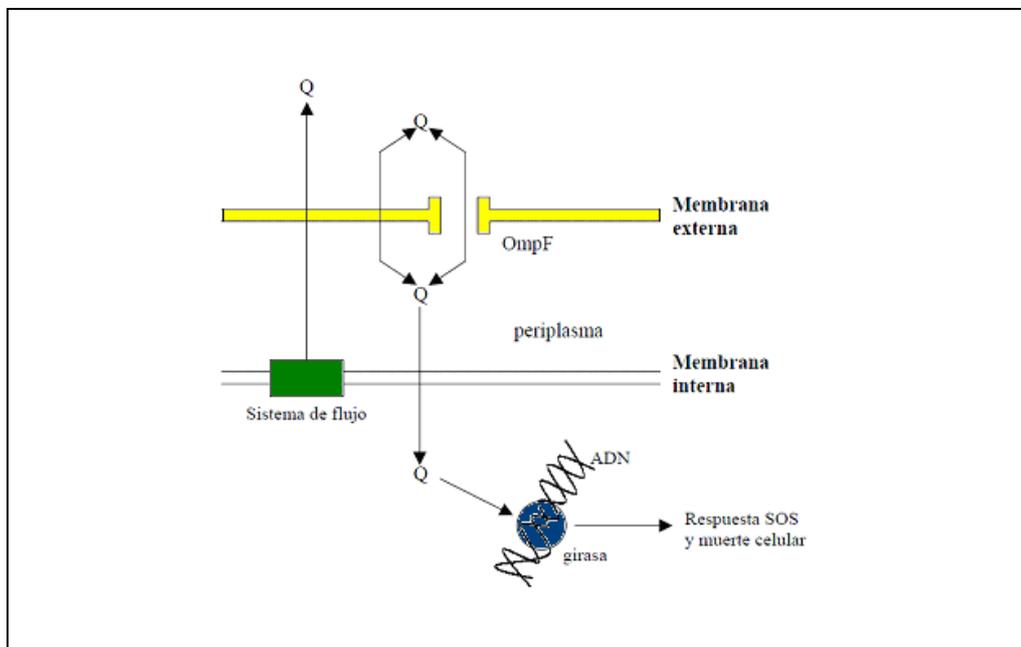
Uno de los sistemas más conocidos es el sistema de transporte denominado AcrAB de *E. coli*, el cual está codificado en los genes *acrAB* y parece tener como función fisiológica la protección de las células frente a sales biliares y ácidos grasos que son tóxicos habituales de su entorno fisiológico. Este sistema se sitúa en la membrana interna de los microorganismos y es un proceso inespecífico y dependiente de energía, ligado a un gradiente de protones. El sistema AcrAB está compuesto por el transportador AcrAB y la proteína periplasmática accesoria AcrA. Se cree que AcrA, de forma alargada, aproxima la membrana externa e interna, formando un trímero que interacciona con el monómero AcrB; bombeando así una gran variedad de sustancias, incluidas las quinolonas, presumiblemente a través del canal TolC (Sanchez-Céspedes *et al.*, 2003). Es importante destacar que la expresión de los genes *acrAB* aumenta de forma considerable en los mutantes Mar (*multiple antibiotic resistant*), lo que implica que dicho locus en *E. coli*, no sólo regula la expresión de la porina OmpF, sino también la expresión de la bomba AcrAB. Mutantes Mar presentan resistencias a las quinolonas, debido a una disminución en la permeabilidad de la membrana externa y a una importante expulsión activa a través de la membrana interna (Zeller *et al.*, 1997; Giraund *et al.*, 2000; Weber y Piddock, 2001) (figura 14).

Este proceso de secreción puede permitir que las bacterias sobrevivan durante un corto periodo de tiempo para poder desarrollar posteriormente resistencias a las quinolonas vía mutaciones en los lugares clave de los genes de las enzimas dianas de estos agentes antibacterianos.



**Figura 14.** Sistema de transporte activo en *E. coli*.

Los mecanismos de resistencia pueden manifestarse solos o combinados, sin embargo, parece que *in vivo* el aumento en el grado de resistencia a las quinolonas es producto de varios mecanismos simultáneos o secuenciales (figura15).



**Figura 15.** Entrada y expulsión de las quinolonas en *E. Coli*.

#### 5.4. RESISTENCIA MEDIADA POR PLÁSMIDOS

Llegado este punto debemos hablar también de una resistencia mediada por plásmidos. Por el mecanismo de acción de las quinolonas parecía poco probable encontrar mecanismos de resistencia plasmídica a estos antibacterianos. Sin embargo, en 1967, Barbour aisló cepas de *E. coli* resistentes al ácido nalidíxico que presentaban un mecanismo de resistencia codificado en un plásmido. Este tipo de resistencia fue descrito posteriormente en *Shigella dysenteriae* (Munshi *et al.*, 1987). En los últimos años también se ha señalado tal resistencia en cepas de *K. pneumoniae* (Martínez-Martínez *et al.*, 1998) y más tarde en *E. coli* (Jacoby *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003). En estas cepas, se ha señalado su resistencia a fluoroquinolonas con la presencia de un plásmido conjugativo, denominado pMG252. Dicho plásmido contiene el gen *qnr*, que codifica la proteína Qnr, capaz de proteger a la ADN-girasa de *E. coli* de la inhibición de la ciprofloxacina. Respecto a la topoisomerasa IV, diana secundaria de las quinolonas en *E. coli*, parece que no se ve afectada por dicha proteína (Tran y Jacoby, 2002) faltando aún por elucidar cómo es que interfiere en la unión de la quinolona a la ADN-girasa (Pascual, 2003). Las cepas de *E. coli* portadoras de este plásmido son susceptibles al ciprofloxacino, debido a que el gen *qnr* confiere un bajo nivel de resistencia. Sin embargo, no deja de ser interesante que esta nueva característica coadyuve a la adquisición de mutaciones que confieran resistencia. La demostración *in vitro* de la transmisión de este plásmido por conjugación a otras Enterobacterias sugiere un posible riesgo de incremento de resistencia a las fluoroquinolonas en el futuro (Pascual, 2003).

#### 5.5. MUTACIONES ADAPTATIVAS Y RESISTENCIA

Generalmente se ha asociado la resistencia bacteriana a quinolonas a la selección de mutaciones preexistentes en una población bacteriana dada, denominándose a este tipo de sucesos mutacionales: *mutaciones relacionadas con el crecimiento*. Sin embargo, cada vez hay más datos sobre otro tipo de sucesos mutacionales que ocurren al exponer las células bacterianas a un proceso selectivo.

Este tipo de mutación se denomina *independiente del crecimiento celular*, y también *mutación adaptativa*.

Las *mutaciones adaptativas* se caracterizan porque ocurren en células que no están dividiéndose o que lo hacen lentamente, y por estar bajo una determinada presión selectiva. Además, parece ser que sólo producen fenotipos que favorecen el crecimiento de las células en las condiciones selectivas en que se encuentran. Los mecanismos para explicar las mutaciones adaptativas parecen ser aún desconocidos. No obstante, se sugiere que el diferente espectro mutacional de células en crecimiento y células sin dividirse (*mutaciones adaptativas*) son un reflejo de actividades diferenciales de los sistemas de reparación (Riesenfeld *et al.*, 1997; Janion, 2000).

Experimentalmente se ha descrito la aparición de mutaciones adaptativas *in vitro*, al tratar *E. coli* con ciprofloxacino. En estos estudios se ha llegado a la conclusión de que las primeras colonias de mutantes espontáneos en aparecer son probablemente el resultado de mutaciones preexistentes en la población inicial, mientras que las colonias de mutantes que van apareciendo desde unos pocos días hasta aproximadamente un mes de incubación, serían consecuencia de mutaciones adaptativas (Riesenfeld *et al.*, 1997).

Las resistencias que presentan las bacterias frente a las quinolonas son cruzadas entre las de la primera generación (ácido nalidíxico, ácido oxolínico) y parece serlo también entre las fluoroquinolonas entre sí. Pero no parece que exista resistencia cruzada entre ambos grupos ni con otros quimioterápicos y antibióticos (Azanza *et al.*, 2003).

## 6. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y EFECTO POST-ANTIBIÓTICO

### 6.1. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Se ha demostrado en estudios *in vitro* que el ácido nalidíxico es activo sobre la mayoría de las bacterias Gram negativas responsables de infecciones urinarias: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis*, *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., entre otras. Sin embargo, se ha observado que las bacterias desarrollan a menudo resistencias, especialmente *Klebsiella* spp. y *Proteus* spp. También son sensibles al ácido nalidíxico los bacilos Gram negativos del aparato gastrointestinal, resultando resistentes las bacteria gram positivas (*Mycobacterium tuberculosis*).

Las restantes quinolonas no fluoradas, presentan un espectro similar, pero muestran en general mayor actividad. Por ejemplo, el ácido pipemídico, se muestra activo frente a *Pseudomonas aeruginosa*, presentando una actividad variable frente a estafilococos y estreptococos.

Con respecto a las fluoroquinolonas, son mucho más activas que las quinolonas de primera generación y su espectro es más amplio. Son activas frente a todas las bacterias Gram negativas sensibles a las primeras quinolonas, frente a otros gérmenes Gram negativos, algunos Gram positivos e, incluso, micobacterias. El norfloxacino, el pefloxacino y el enoxacino muestran usualmente una actividad comparable. El ofloxacino es más activo frente algunos gérmenes, y entre las quinolonas de segunda generación destaca el ciprofloxacino por su mayor actividad.

Todas las fluoroquinolonas resultan muy activas frente a enterobacterias, especialmente *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp, *Enterobacter* spp. Las especies de *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Acinetobacter*, *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus*, así como algunas cepas de *Campylobacter*, son sensibles a las fluoroquinolonas. También son sensibles *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus ducreyi*, *Branhamella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae* (incluidos gonococos productores de penicilinas) y *Neisseria meningitidis*.

Las fluoroquinolonas son también efectivas frente a gérmenes aerobios Gram positivos, pero menos que frente a los Gram negativos. El ciprofloxacino, el ofloxacino y el pefloxacino pueden inhibir a *Staphylococcus aureus*. La eficacia bactericida del moxifloxacino frente a las cepas de este germen resistente a la metilicina es superior a la observada con otros agentes, como vancomicina, gentamicina y rifampicina. *Staphylococcus epidermidis* también puede ser sensible a las fluoroquinolonas. La actividad de las fluoroquinolonas es menor en infecciones por *Streptococcus*, pero las de la tercera generación muestran, por lo general, actividad *in vitro* frente a *Streptococcus pneumoniae*. En particular, el moxifloxacino ha demostrado una excelente actividad frente a este patógeno.

Las quinolonas de segunda generación poseen una actividad moderada o baja frente a la mayoría de los patógenos anaerobios. Tanto *Clostridium* spp. como los bacteroides suelen ser resistentes. *Fusobacterium* spp. es sólo moderadamente sensible al ciprofloxacino y al ofloxacino. El anaerobio facultativo *Gardnerella vaginalis* es sensible o moderadamente sensible al ciprofloxacino, pero no parece sensible a otras quinolonas de segunda generación.

Cuando hablamos de las quinolonas más modernas, el cinafloxacino destaca por su actividad *in vitro* sobre gérmenes anaerobios. El moxifloxacino es activo frente a diversos patógenos anaerobios, que si bien no suelen causar infecciones respiratorias, pueden estar involucrados en diversos casos de sinusitis y neumonía por aspiración, especialmente *Bacteroides fragilis*.

El ciprofloxacino, el ofloxacino y las quinolonas de tercera generación son activas frente a la mayoría de las micobacterias, incluida *Mycobacterium tuberculosis*. *Chlamydia trachomatis* es moderadamente sensible al ciprofloxacino y al ofloxacino, y algunas cepas de *Plasmodium* spp. resistentes a la cloroquina han mostrado sensibilidad *in vitro* al norfloxacino.

En cuanto a las fluoroquinolonas de última generación, parece que todavía no existen datos en Medicina Veterinaria, sólo datos a nivel de estudios experimentales (Caputo *et al.*, 1997; Watts *et al.*, 1997; Papich y Riviere, 2003). Estos fármacos, como por ejemplo el grepafloxacino, trovafloxacino y premafloxacino, poseen una

mayor actividad frente a cocos Gram positivos y bacterias anaerobias, por lo que podrían resultar ventajosos en algunas infecciones (Brighty y Gootz, 1997). Podemos señalar que el premafloxacino tiene una mayor actividad frente a las bacterias Gram positivas que el enrofloxacino, y también presenta actividad frente algunas cepas de estafilococos resistentes a la meticilina y de enterococos resistentes a la vancomicina. Frente a bacterias Gram negativas, especialmente *Pseudomonas aeruginosa*, estos fármacos no son tan activos como el ciprofloxacino. Además, se ha cuestionado la actividad de estos fármacos frente a estreptococos y no parece ser superior a un tratamiento estándar con un antibiótico de tipo  $\beta$ -lactámico (Legg y Bint, 1999).

En general, las fluoroquinolonas tienen poca actividad contra los anaerobios y son menos eficaces contra anaerobios facultativos desarrollados en condiciones anaeróbicas. El mecanismo de resistencia intrínseca de este tipo de bacterias es poco conocido (Mckellar, 1996).

La actividad *in vitro* de las fluoroquinolonas tiene buena correlación clínica. Sin embargo, algunos de los compuestos exhiben una actividad considerablemente menor (de hasta 100 veces) en presencia de orina (Wolfson y Hooper, 1985), aunque otros, como el marbofloxacino, han mantenido su actividad bactericida en orina hasta cinco días posteriores a una única aplicación. . En 1996, Wetzstein y De Jong demostraron que con un pH ligeramente ácido (aquel que se puede observar en abscesos, tejidos inflamatorios y fagocitos) se reduce la tasa de muerte de algunas bacterias en presencia de enrofloxacino. Este descenso de actividad puede ser debido a que en pH ácidos la mitad piperacínica queda cargada positivamente, lo cual impide la penetración en la célula y/o la interacción intracelular. El alto contenido de la orina en cationes metálicos divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ) podría ser también responsable de la menor actividad (Brown, 1996; Lorenzo y Aleixandre, 2008). Por el contrario, a pH 8 (alcalino) la actividad bactericida de la mayoría de las fluoroquinolonas, en particular del enrofloxacino casi no sufre variación.

En la tabla siguiente, y a modo de resumen, se muestra la actividad antibacteriana de las quinolonas (tabla 4):

**Tabla 4.** Actividad antibacteriana de las quinolonas (Lorenzo y Aleixandre, 2008).

- Las quinolonas no fluoradas (primera generación) son activas sólo frente a gérmenes Gram negativos, y son antisépticos urinarios en sentido estricto.
- Las quinolonas fluoradas de segunda generación tienen un espectro de acción más amplio y se utilizan también en infecciones sistémicas, pero son poco activas frente a cocos Gram positivos aerobios y bacterias anaerobias. La ciprofloxacina destaca por su mayor actividad.
- Las quinolonas fluoradas de tercera y cuarta generación son más activas sobre estreptococos y estafilococos y se utilizan principalmente en infecciones respiratorias.

En el caso particular del fármaco en estudio, el enrofloxacin, podemos señalar que muestra buena actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluyendo algunos patógenos anaerobios, siendo eficaz asimismo contra *Mycoplasma spp.* A bajas concentraciones es bactericida y micoplásmica, y es eficaz contra organismos que son resistentes a los  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas, antagonistas del ácido fólico y macrólidos (Bauditz, 1987a y b). Cuando se comparó su efecto *in vitro* con el de otros antimicrobianos tales como la gentamicina, ampicilina, cloranfenicol, tetraciclinas, trimetoprim/sulfametoxazol, penicilina G y oxacilina, se observó que el enrofloxacin era claramente superior en el rango de los Gram negativos. Los valores de CIM para cocos Gram positivos estaban dentro del rango de eficacia de la penicilina G, ampicilina, oxacilina y gentamicina, aunque el enrofloxacin fue superior en eficacia contra estafilococos metilino resistentes. Comparada con otros derivados quinolónicos de uso en Medicina Veterinaria (por ejemplo flumequine) el enrofloxacin se distingue por un valor de CIM considerablemente menor y la ventaja adicional de su eficacia contra *Mycoplasma spp.*, *Pseudomonas spp.* y *Streptococcus spp.* (Scheer, 1987a). Más del 50% de los aislamientos de *P. aeruginosa* realizados a partir de perros, gatos, caballos, cerdos y vacuno demostraron susceptibilidad al enrofloxacin. Además, el hecho de que el enrofloxacin sea micoplásmica le da ventajas frente a otros agentes (Anadón *et al.*, 1995).

El enrofloxacino se metaboliza en parte a ciprofloxacino, siendo este metabolismo beneficioso desde el punto de vista microbiológico, ya que muchas bacterias Gram negativas tienen valores de CIM menores para el ciprofloxacino, y es probable que el efecto antimicrobiano sea aditivo entre el fármaco original (enrofloxacino) y el metabolito (ciprofloxacino) (Mengozzi *et al.*, 1996).

En la tabla 5 se muestran los rangos de CIM para microorganismos sensibles al enrofloxacino. El punto de corte para sensibilidad-resistencia al enrofloxacino fue establecido en 2µg/ml (Scheer, 1987a).

**Tabla 5.** Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIM<sub>90</sub> en µg/ml) para algunos microorganismos sensibles al enrofloxacino (Otero *et al.*, 2001a).

CIM <sub>90</sub> (µg/ml)			
≥ 2,0 µg/ml	<i>Bordetella bronchiseptica</i> (8)	<i>Campylobacter coli</i> . (5)	
≥ 1,0 µg/ml	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (3) <i>Actinomyces pyogenes</i> (1) <i>Streptococcus suis</i> (1) <i>Campylobacter jejuni</i> (5)	<i>Streptococcus</i> spp. (3) <i>Rhodococcus equi</i> (1) <i>Streptococcus zooepidemicus</i> (1)	<i>Enterococcus</i> spp. (3) <i>Streptococcus equi</i> (1) <i>Mycoplasma hyorhinae</i> (7)
≥ 0,4 µg/ml	<i>Pseudomonas</i> spp. (3) <i>Mycoplasma iowae</i> (7)	<i>Staphylococcus</i> spp. (3) <i>Staphylococcus aureus</i> (10)	<i>Mycoplasma synoviae</i> (7)
≥ 0,2 µg/ml	<i>Proteus</i> spp. (3) <i>Staphylococcus aureus</i> (9) <i>Chlamydia psittaci</i> (6)	<i>Escherichia coli</i> (3) <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> (4) <i>Mycoplasma hyosynoviae</i> (7)	<i>Staphylococcus hyicus</i> (2) <i>Mycoplasma bovis</i> (7) <i>Mycoplasma agalactiae</i> (7)
≥ 0,1µg/ml	<i>Staphylococcus intermedius</i> (3) <i>Staphylococcus aureus</i> (3)	<i>Salmonella</i> spp. (4) <i>Corynebacterium psedotuberculosis</i> (1)	<i>Escherichia coli</i> (4) <i>Mycoplasma gallisepticum</i> (7)
≥ 0,05 µg/ml	<i>Klebsiella</i> spp. (3) <i>Escherichia coli</i> (3) <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> (1)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (3) <i>Staphylococcus intermedius</i> (3) <i>Streptococcus</i> spp. (10)	<i>Proteus mirabilis</i> (3) <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> (7)
≥ 0,02 µg/ml	<i>Pasteurella multocida</i> (3) <i>Pasteurella haemolytica</i> (1,10)	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (4) <i>Salmonella typhimurium</i> (1)	<i>Salmonella dublin</i> (1)
≥ 0,01µg/ml	<i>Actinobacillus suis</i> (1) <i>Haemophilus somnus</i> (1)	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (1)	<i>Pasteurella multocida</i> (1,3)

(1) Küng *et al.*, 1993; (2) Wegener *et al.*, 1994; (3) Cester *et al.*, 1996; (4) Scheer *et al.*, 1996; (5) Aarestrup *et al.*, 1997; (6) Butaye *et al.*, 1997; (7) Hannan *et al.*, 1997; (8) Speakman *et al.*, 1997; (9) Salmon *et al.*, 1998; (10) Haritova *et al.*, 2003.

Como hemos podido observar, las fluoroquinolonas son bactericidas de acción rápida al actuar específicamente sobre el ADN. Son activas a muy bajas concentraciones, y muestran efecto postantibiótico (EPA) (Vancutsem *et al.*, 1990).

## 6.2. EFECTO POSTANTIBIÓTICO DE LAS QUINOLONAS

El término efecto postantibiótico (EPA) se utiliza para describir la persistencia de la inhibición del crecimiento bacteriano tras una corta exposición del microorganismo a los agentes antimicrobianos. Es un fenómeno asociado a la actividad inhibitoria de la mayor parte de las sustancias con acción antibacteriana y se produce cuando éstas se ensayan a concentraciones iguales o superiores a la CMI (Craig y Vogelmann, 1987). El EPA se demuestra por seguimientos microbiológicos después de la eliminación del antimicrobiano.

Se ha observado EPA con la mayoría de las familias de antibacterianos (Pastor *et al.*, 1992a y b) y con varios antisépticos (Juliano *et al.*, 1992) y antifúngicos (Turnidge *et al.*, 1994), aunque la mayoría de los estudios publicados se refieren a los antimicrobianos más utilizados, como son  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, macrólidos y quinolonas.

La duración del EPA se ve influenciada, principalmente, por el tipo de microorganismo y antimicrobiano, así como por la concentración del mismo y la duración de la exposición (Pastor *et al.*, 1992a y b). En general, después de una hora de exposición a concentraciones entre la CMI y diez veces la CIM, la duración del EPA oscila entre una y dos horas. Distintos estudios han permitido observar EPA más largos (más de tres horas), consiguiéndose éstos con concentraciones de antimicrobiano de 400 a 600 veces la CMI.

Las fluoroquinolonas ejercen EPA sobre varias cepas bacterianas, incluyendo, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* (Brown, 1996). El ciprofloxacino y el norfloxacino inducen EPA de 1,8 a 2,4 horas sobre *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, y el marbofloxacino ha demostrado un EPA de 2 a 3 horas contra *S. intermedius*. En cuanto al enrofloxacin, se ha observado que muestra un EPA de 1 a 4 horas de duración (según dosis y microorganismo) contra *S. intermedius*, *P. multocida*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* y *S. aureus* (Spreng *et al.*, 1995; Cester *et al.*, 1996; Mckellar, 1996).

El estudio del EPA viene reforzado por sus implicaciones clínicas, ya que los microorganismos durante la fase de EPA pueden tener mayor sensibilidad a bajas

concentraciones de antimicrobiano y mayor sensibilidad a la acción antibacteriana de los leucocitos polimorfonucleares, así como disminuída su actividad hemolítica y producción de toxinas. La duración del EPA influye mucho a la hora de establecer la dosificación de los antimicrobianos. Así, se ha sugerido que el intervalo óptimo de dosificación no debería ser más largo que la suma del tiempo en que la concentración de antibacteriano en suero excede la concentración mínima inhibitoria (CMI) más la duración del EPA. Consecuentemente, los antimicrobianos con elevada actividad inhibitoria y un EPA largo podrían permitir una dosificación más espaciada sin pérdida de efectividad en el tratamiento, lo cual podría ser óptimo en términos de eficacia, toxicidad y coste económico. Los estudios del EPA de los antibacterianos son, por tanto, clínicamente importantes.

## 7. USOS CLÍNICOS

### 7.1. ESPECTRO DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y USOS CLÍNICOS DEL ENROFLOXACINO EN DISTINTAS ESPECIES ANIMALES

#### 7.1.1. Ovinos

Las fluoroquinolonas son útiles en rumiantes debido a que son activas frente a sus patógenos más importantes.

En aquellos estudios en los que se trató con enrofloxacino a ovejas con mastitis agudas causadas por *Staphylococcus aureus*, se obtuvo una rápida restauración del órgano y la reanudación de la producción normal de leche. Sin embargo, no ocurrió lo mismo en ovejas afectadas de agalactia contagiosa (*Mycoplasma agalactiae* var. *Agalactiae*) ni en aquellas con mastitis gangrenosa (*Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens*), en las cuales hubo recuperación del estado general pero las lesiones en las ubres permanecieron sin cambios e interfirieron con la producción de leche (Catarsini *et al.*, 1995).

En corderos afectados de enteritis por *E. coli* se obtuvo una rápida recuperación clínica (Catarsini *et al.*, 1995).

#### 7.1.2. Bovinos

En bovinos adultos, Lekeux y Art (1988) informaron la alta eficacia de bajas dosis de enrofloxacino en el tratamiento de la fiebre de embarque, atribuible a la actividad del compuesto frente a *Pasteurella* spp. y *Mycoplasma* spp. Asimismo, se obtuvieron buenos resultados en el tratamiento de mastitis bovinas causadas por *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (Walser *et al.*, 1993) y *Mycoplasma bovis* (Anduriz *et al.*, 1996). Algunos autores, como Sumano (1993), citan que existe eficacia terapéutica para mastitis causada por *Streptococcus* spp., mientras otros, tal es el caso de Walser *et al.* (1993), sostienen que el efecto antibacteriano no es suficiente.

Los valores de CMI<sub>90</sub> existentes para *Haemophilus somnus*, *Pasteurella haemolytica* y *P. multocida* son de 0.03, 0.06 y 0.03 µg/ml, respectivamente. El enrofloxacino está aprobado para tratar la enfermedad respiratoria bovina (ERB) asociada a estos patógenos (Papich y Riviere, 2003).

En terneros se demostró la eficacia del enrofloxacino en diarrea y sepsis producidas por *E. coli*, así como en infecciones experimentales del tracto respiratorio por *Pasteurella haemolytica* y *Mycoplasma bovis*, y en infecciones latentes o manifiestas producidas por *Salmonella* spp.

### 7.1.3. Equinos

En equinos, el enrofloxacino alcanza concentraciones tisulares elevadas, siendo utilizada en esta especie para el tratamiento de infecciones articulares, endometritis, neumonía, pleuroneumonía e infecciones ortopédicas causada por organismos resistentes a otros fármacos.

Los ensayos de susceptibilidad *in vitro* realizados después del tratamiento con enrofloxacino sobre 121 cepas bacterianas aisladas de equinos indicaron que el 100% de las bacterias Gram negativas (*E. coli*, *Taylorella equigenitalis*, *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Actinobacillus equuli*) y Staphylococcus coagulasa positivos (SCP), son susceptibles al enrofloxacino a CIM < 0.5 µg/ml. Sin embargo, la susceptibilidad de *P. aeruginosa* es variable, existen cepas que pueden ser resistentes o sólo moderadamente sensibles. Para *S. equi*, la CIM<sub>90</sub> es de 1 µg/ml (Giguère *et al.*, 1996). Varias cepas de *Salmonella* spp. aisladas de equinos (*S. typhimurium*, *S. Thompson*, *S. Heidelberg*, *S. hadar*, *S. enteritidis*, *S. infantis* y *S. derby*) son sensibles al enrofloxacino (Van Duijkeren *et al.*, 1995).

### 7.1.4. Porcinos

El enrofloxacino es eficaz en el tratamiento del síndrome Mastitis-Metritis-Agalaxia (MMA), una de las enfermedades de mayor impacto económico para la cría

porcina. Está causada principalmente por *E. coli* y *Klebsiella sp.* y se caracteriza porque la hembra no puede producir leche. También es eficaz en infecciones producidas por *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *C. coli*, *C. jejuni* y *E.coli enterotoxigénica* (Otero *et al.*, 2001a).

La mayoría de los aislados de *Streptococcus suis* (Aarestrup *et al.*, 1998) son sensibles al enrofloxacino, además el fármaco tiene buena actividad frente a *S. choleraesuis*, *S. typhimurium*, *S. dysgalactiae* subsp. *Equisimilis*, *S. equi* subsp. *Equi* y *S. equi* subsp. *Zooepidemicus* aislados de cerdos.

Las concentraciones plasmáticas alcanzadas después de la administración oral en bolo o con el alimento, son superiores a las CIM<sub>90</sub> para *P. multocida*, *M. hyopneumoniae*, *A. pleuropneumoniae*, *E. coli* y *Salmonella spp.* (Hannan *et al.*, 1989; Richez *et al.*, 1994a; Scheer, 1996).

#### **7.1.5. Caninos**

Las fluoroquinolonas se han utilizado ampliamente en los últimos años para tratar diversas infecciones en esta especie animal. Los ensayos experimentales y clínicos han demostrado resultados positivos en infecciones de la piel, tejidos blandos, cavidad oral, tracto genitourinario, próstata, oído medio y externo, infecciones de heridas, tracto respiratorio y huesos (Paradis *et al.*, 1990; Vancutsem *et al.*, 1990; Cotard *et al.*, 1995; Dorfman *et al.*, 1995; Hawkins *et al.*, 1998; Carlotti *et al.*, 1999).

En el caso particular del enrofloxacino, se ha observado que en tejidos y fluidos prostáticos alcanza concentraciones mayores que las CIM de casi todos los microorganismos causantes de infecciones del tracto urinario (Dorfman *et al.*, 1995). También es eficaz en el tratamiento de piodermitis causadas por *Staphylococcus intermedius*, constituyendo una buena alternativa frente a cepas meticilino resistentes (Paradis *et al.*, 1990; Piriz *et al.*, 1996; Pellerin *et al.*, 1998; Carlotti *et al.*, 1999).

Las altas concentraciones de antimicrobiano alcanzadas en macrófagos alveolares y en el fluido del epitelio de revestimiento pulmonar, permiten asegurar el

éxito de la terapia con enrofloxacino en infecciones de las vías respiratorias altas de los perros (Hawkins *et al.*, 1998). Sin embargo, las concentraciones alcanzadas en los tejidos (a las dosis recomendadas por el fabricante) no son totalmente eficaces cuando las infecciones son causadas por *Pseudomonas aeruginosa* (Duval y Budsberg, 1995).

El enrofloxacino es tan eficaz como la doxiciclina y el cloranfenicol en infecciones causadas por *Rickettsia rickettsii* (Breischwerdt *et al.*, 1991), resultando también eficaz frente a *Stapylococcus* spp.  $\beta$ -hemolíticos. Además, demuestra sinergia con la estreptomicina frente a cepas de *Brucela canis* (Otero *et al.*, 2001a).

El enrofloxacino se ha estudiado con éxito para tratar la ehrlichiosis aguda en perros causada por *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia platys* con dosis de 5 mg/kg una vez al día durante 15 días (Kontos y Athanasiou, 1998). Sin embargo, el éxito en el tratamiento de la ehrlichiosis crónica no se ha demostrado.

#### **7.1.6. Felinos**

Los hallazgos clínicos sugieren que el enrofloxacino es eficaz en el tratamiento de infecciones causadas por micobacterias oportunistas, *Mycobacterium fortuitum* y *M. smegmatis* en gatos (Studdert y Hughes, 1992; Hanan *et al.*, 1997). Los datos de susceptibilidad *in vitro* indican que el enrofloxacino debería ser también eficaz contra *Bartonella* spp en esta especie. Sin embargo, estudios *in vivo* muestran que es necesaria una terapia de varias semanas, y que la bacteriemia no desaparece en todos los animales (Kordick *et al.*, 1997; Otero *et al.*, 2001a).

#### **7.1.7. Aves**

El enrofloxacino es eficaz en tratamientos preventivos y terapéuticos de pollos con infecciones experimentales causadas por *E. coli*, *S. typhymurium*, *S. gallinarum*, *S. arizonae*, *S. pullorum*, *H. paragallinarum*, *P. multocida*, *E. rhusiopathiae* (Bauditz, 1987b), *Mycoplasma gallisepticum* (Ortiz *et al.*, 1995);

también lo es en infecciones naturales por *E. coli*, *M. gallisepticum*, y asociaciones entre *E. coli* y *Mycoplasma* spp. (Sumano *et al.*, 1998).

En cuanto a los pavos, se ha observado que el enrofloxacino es eficaz *in vitro* frente a *E. coli*, *Salmonella* spp. (Heinen *et al.*, 1997) y *Chlamydia psittaci* (Butaye *et al.*, 1997), aunque la experiencia sugiere que el enrofloxacino hace disminuir los signos clínicos pero no elimina la infección (Flammer, 1998). En estas aves, también es eficaz para prevenir la transmisión vertical de *Mycoplasma iowae* (Jordan *et al.*, 1993) y *Mycoplasma gallisepticum* (Delaporte *et al.*, 1994), de modo que el tratamiento con enrofloxacino en períodos estratégicos podría ser útil en el control de micoplasmosis, limitando tanto la transmisión vertical como horizontal.

El tratamiento con enrofloxacino en el agua de bebida podría ser efectivo contra *Pasteurella anatis*, un importante agente infeccioso de los patos (Froyman *et al.*, 1994).

El enrofloxacino es eficaz en la profilaxis y en el tratamiento de aves con psitacosis (Lindenstruth y Frost, 1993).

#### **7.1.8. Pequeños mamíferos**

El enrofloxacino y otras fluoroquinolonas se usan habitualmente en pequeños mamíferos, tales como el conejo, en animales de laboratorio como el ratón y la rata, y en especies exóticas para tratar tanto infecciones cutáneas como viscerales (Broome y Brooks, 1991a; Cabanes *et al.*, 1992; Göbel, 1999). Una de las razones del uso de las fluoroquinolonas en estos pequeños mamíferos es su potente actividad frente a patógenos Gram negativos, acompañada de su excelente absorción oral.

El enrofloxacino es eficaz en el tratamiento de conejos con septicemia aguda causada por *Pasteurella multocida* (Okerman *et al.*, 1990), y aunque no erradica completamente la bacteria se le considera el fármaco de elección (Broome y Brooks, 1991a; Göbel, 1999).

### **7.1.9. Otras especies**

En peces de crianza artificial se han obtenido muy buenos resultados con este fármaco en el tratamiento de los patógenos habituales (Dalsgaard y Bjerregaard, 1991; Stoffregen *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 1997). En estudios *in vitro* el enrofloxacino fue el antimicrobiano de mayor actividad frente a los siguientes agentes infecciosos de peces: *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida*, *Vibrio salmonicida*, *Vibrio anguillarum* y *Yersinia ruckeri* (Martinsen *et al.*, 1992).

Se ha comprobado su eficacia en el tratamiento de enfermedades bacterianas de tortugas, especialmente en enfermedades del tracto respiratorio alto causadas por *Mycoplasma* spp. y *Pasteurella* spp. (Jacobson, 1991; Prezant *et al.*, 1994).

## **8. TOXICIDAD Y EFECTOS ADVERSOS. INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS**

### **8.1. TOXICIDAD Y EFECTOS ADVERSOS**

En general, los derivados quinolónicos son seguros y bien tolerados. Aunque son un grupo con un buen balance beneficio/riesgo también presentan numerosos efectos adversos. Se ha demostrado, sin embargo, que dichos efectos son leves y reversibles al interrumpirse el tratamiento. La toxicidad de las fluoroquinolonas depende de la dosis y la especie animal de destino (Bertino y Fish, 2000).

Según los diversos estudios realizados se han informado efectos tóxicos de las quinolonas sobre los sistemas nervioso (ataxia, crisis epilépticas, desvanecimiento, somnolencia y temores, Stahlmann, 2002), cardiovascular (prolongación del intervalo QT y arritmias, Stahlmann, 1999; Satoh *et al.*, 2000) y gastrointestinal del hombre y de los animales (como náuseas, vómitos y diarrea), así como condrotoxicidad, toxicidad sobre la reproducción y el desarrollo, genotoxicidad, carcinogénesis, fototoxicidad (urticaria, eritemas y quemaduras solares) (Sprandel y Rodvold, 2003; Hayashi *et al.*, 2004) y toxicidad ocular (degeneración retiniana en gatos y cataratas subcapsulares) (Schlüter, 1987; Takayama *et al.*, 1995).

La pobre estabilidad de las fluoroquinolonas en orina ácida puede causar cristaluria renal en animales que no estén adecuadamente hidratados (Mckellar, 1996).

En la información suministrada por los fabricantes de enrofloxacin se especifica que se han hecho pruebas de teratogenicidad, embriotoxicidad y mutagenicidad, con resultados de completa inocuidad, y que no hubo efectos indeseables en el sistema nervioso central y cardiovascular, como así tampoco efectos alérgicos. En 2004, Yoon *et al.* investigaron el efecto del enrofloxacin sobre un cultivo de células de tendón de caballos, adultos y jóvenes. En este estudio se observó que el enrofloxacin inhibía la proliferación celular, inducía cambios morfológicos, disminuía el número total de monosacáridos, y alteraba la síntesis de proteoglicanos. Todos estos efectos resultaron más marcados en cultivos celulares de

animales jóvenes, por lo que no se recomienda el uso de enrofloxacino en potros jóvenes al ocasionar artropatías y defectos en el cartílago (Stahlmann, 2002). Tampoco se recomienda en gatos y perros menores de 8 meses y 1 año respectivamente.

Kaartinen *et al.* (1995) observaron durante sus estudios que el enrofloxacino resultaba muy irritante cuando se administraba por vía intramuscular, ocasionando un marcado aumento de la creatinquinasa en suero así como inflamación y dolor en el sitio de inyección en algunos casos.

Los efectos tóxicos anteriormente expuestos han llevado a retirar del mercado determinados derivados quinolónicos, como son el temafloxacino, el grepafloxacino, el trovafloxacino o el alatrofloxacino, ya que presentaban problemas de toxicidad graves.

A pesar de todo, las nuevas fluoroquinolonas son esencialmente un grupo de antibacterianos bien tolerados, cuyos beneficios sobrepasan claramente sus desventajas en un amplio ámbito de indicaciones terapéuticas. Su eficacia clínica ha sido el mayor determinante para que estos compuestos hayan tenido éxito en el mercado a pesar de su posible toxicidad. Actualmente, se continúa investigando para desarrollar fluoroquinolonas más seguras e incluso más activas por medio de modificaciones químicas tanto a nivel del núcleo como de los sustituyentes de cada posición.

## **8.2. INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS**

Se han descrito numerosas interacciones entre quinolonas y otros fármacos, cuya importancia depende del derivado quinolónico que se considere. Las más importantes y generales se resumen a continuación.

Una de las interacciones más importantes resulta de la administración simultánea de algunas quinolonas con derivados de la xantina como es la cafeína y, en mayor medida, la teofilina. Como resultado de esta administración conjunta se ha observado una disminución del aclaramiento hepático de la teofilina y cafeína,

seguido de un aumento de la semivida plasmática, así como de un aumento de sus concentraciones séricas. Todo ello lleva a la aparición de los síntomas de una intoxicación por teofilinas (náuseas, vómitos, insomnio, cefalea, mareos, vértigos, temblores, taquicardia, e incluso convulsiones) (Brown, 1996; Niki *et al.*, 1998; Blondeau, 1999; Lode, 2001).

La administración conjunta de fluoroquinolonas y compuestos que contengan metales catiónicos provoca una disminución de la absorción intestinal de estos últimos debido a la formación de complejos insolubles. La quelación con cationes metálicos es una de las interacciones que afecta a las quinolonas de una forma general, aunque parece más importante para las quinolonas que presentan menor número de sustituyentes en la estructura básica y en el anillo piperacínico como ciprofloxacino, norfloxacino y enoxacino (Nix *et al.*, 1990; Deppermann *et al.*, 1993).

Por otro lado, la administración conjunta de quinolonas y algunos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) potencia el efecto convulsivante de las quinolonas debido a una posible sinergia en la inhibición de la unión a los receptores del GABA (De Sarro y De Sarro, 2001). Sin embargo, esta interacción no se produce en quinolonas de tercera y cuarta generación (Stein, 1996).

Por último, debemos señalar que el Probenecid puede disminuir el aclaramiento renal de las fluoroquinolonas (Aminimanizani *et al.*, 2001) y que la administración conjunta de quinolonas con warfarina o digoxina puede provocar un aumento de arritmias y/o problemas cardíacos (Bertino y Fish, 2000). Se ha informado asimismo de un incremento en la frecuencia e intensidad de los ataques en perros epilépticos bajo tratamiento con fenobarbital cuando se administra con enrofloxacin (Vancutsem *et al.*, 1990).

## 9. FARMACOCINÉTICA

En general, las fluoroquinolonas son rápidamente absorbidas en el tracto gastrointestinal tras su administración oral en animales monogástricos, mientras que en rumiantes, las concentraciones sistémicas alcanzadas tras la administración por esta vía están por debajo de los niveles terapéuticos. Distintos autores (Vancutsem *et al.*, 1990; Greene y Budsberg, 1993) observaron que el porcentaje de dosis absorbida por vía oral para el enrofloxacino en rumiantes adultos era tan solo el 10%, mientras que en animales monogástricos superaba el 80%.

Además, presentan una completa absorción parenteral, semividas de eliminación relativamente largas, gran volumen de distribución (2 a 4 l/kg) y excelente penetración tisular (incluyendo fagocitos), eliminándose fundamentalmente por excreción renal y metabolismo hepático (Brown, 1996).

### 9.1. ABSORCIÓN

La absorción oral de las fluoroquinolonas es bastante elevada en la mayoría de las especies animales estudiadas, oscilando su  $t_{max}$  entre 60 y 180 minutos.

Las fluoroquinolonas administradas con alimento pueden presentar una absorción lenta o más prolongada, retrasando el tiempo necesario para alcanzar la  $C_{max}$  (concentración plasmática máxima). Sin embargo el grado de absorción, bien calculado a partir del AUC total (área bajo la curva de la concentración plasmática frente al tiempo), bien por la  $C_{max}$ , no se ve afectado significativamente (Efthymiopoulos *et al.*, 1997; Blondeau, 1999; Johnson *et al.*, 1999; Allen *et al.*, 2000; Gajjar *et al.*, 2002). No obstante, hay que tener en cuenta que la administración conjunta de enrofloxacino con iones bivalentes disminuye la absorción del primero por quelación.

Asimismo, distintos estudios han demostrado que la administración conjunta de enrofloxacino con alimento, prolonga el tiempo de permanencia del mismo tras la administración oral en reptiles, ovejas, cerdos y pollos (Papich y Riviere, 2003).

En 1987, Scheer demostró que el enrofloxacino era fácil y rápidamente absorbido tras la administración parenteral en terneros, cerdos, perros, gatos, pollos y pavos, alcanzándose concentraciones máximas dentro de los 30-120 min (datos referidos también por Mitchell, 2006), y que los niveles de fármaco después de su administración oral a cerdos y pollos eran equivalentes a aquellos encontrados tras la aplicación parenteral de las mismas dosis, lo cual sugería una buena absorción digestiva.

En el **ganado ovino** la biodisponibilidad del enrofloxacino es baja tras la administración oral, alcanzándose valores no superiores al 61% (Pozzin *et al.*, 1997). El estudio llevado a cabo por Bermingham y Papich en 2002 mostró una biodisponibilidad oral del 47,89%. En este estudio se señala que la velocidad de eliminación es hasta tres veces mayor que la velocidad de absorción (cinética flip-flop). Dicho fenómeno ha sido observado, al mismo tiempo, en otros estudios llevados a cabo en distintas especies animales, como caballos adultos (Kartinen *et al.*, 1997a) y cerdos (Anadón *et al.*, 1999) tras la administración oral y en ganado vacuno (Kartinen *et al.*, 1995) tras la administración subcutánea e intramuscular.

Sin embargo, el enrofloxacino se absorbe casi completamente y de forma rápida después de la administración intramuscular. Así, hablamos de biodisponibilidades del 85% (Mengozzi *et al.*, 1996) y 75,35% (Haritova *et al.*, 2003) tras la administración de una dosis de 2,5 mg/kg, y del 83% tras una dosis de 5 mg/kg (Elsheikh *et al.*, 2002)

Por su parte, Pozzin *et al.* (1997) y Bermingham y Papich (2002), obtuvieron unas concentraciones plasmáticas máximas ( $C_{max}$ ) de 0,6 y 1,61  $\mu\text{g/ml}$  ( $t_{max}$ , 330 min) tras la administración oral de 2,5 y 5 mg/kg de enrofloxacino respectivamente.

Mengozzi *et al.* (1996) observaron que tras la administración de una dosis de 2,5 mg/kg de enrofloxacino por vía intramuscular se alcanzaba la  $C_{max}$  (0,78  $\mu\text{g/ml}$ ) a los 75 min. Dichos valores se corresponden con los obtenidos en ovejas lactantes,  $C_{max}$  de 0,74  $\mu\text{g/ml}$  ( $t_{max}$ , 49,8 min). El AUC calculado osciló entre 3,11  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$  (Haritova *et al.*, 2003) y 4,58  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$  (Mengozzi *et al.*, 1996). Elsheikh *et al.* (2002) señalaron una  $C_{max}$  de 1,29  $\mu\text{g/ml}$  alcanzada a los 117,66 min de la administración

intramuscular de una dosis de 5 mg/kg. En este caso, el AUC fue de 7,86  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ , siendo el MAT (tiempo medio de absorción) de 39,51 min.

Mengozzi *et al.* (1996) determinaron que la concentración de enrofloxacino a las 24 horas ( $C_{24\text{h}}$ ) de la administración de 2,5 mg/kg, tanto por vía intramuscular como intravenosa, era de 0,02  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Por su parte, la concentración de enrofloxacino determinada a los 5 minutos de la administración intravenosa se situó en 1,20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . En este mismo estudio se determinó la  $C_{\text{max}}$  del ciprofloxacino, así como la concentración a las 24 horas tras la administración de dicha dosis de enrofloxacino por ambas vías. Los valores obtenidos fueron los siguientes;  $C_{\text{max}}$  0,13  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $t_{\text{max}}$ , 175,2 min) y  $C_{24\text{h}}$  0,02  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para la vía intravenosa y  $C_{\text{max}}$  0,14  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $t_{\text{max}}$ , 300 min) y  $C_{24\text{h}}$  0,05  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Pueden observarse diferencias significativas en cuanto al tiempo en el cual se alcanza la concentración máxima. Es interesante señalar que las concentraciones de enrofloxacino y de su metabolito activo (ciprofloxacino) calculadas a las 24 horas de la administración intravenosa son iguales, mientras que en el caso de la administración intramuscular las concentraciones de ciprofloxacino superan a las del enrofloxacino. El  $\text{AUC}_{0-24}$  (ciprofloxacino) calculado para la vía intravenosa resultó 1,20  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ , valor similar al obtenido para la vía intramuscular (1,83  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ ).

En este mismo estudio (Mengozzi *et al.*, 1996) se pudo comprobar que, las concentraciones plasmáticas, tanto de enrofloxacino como de ciprofloxacino, superaban las CIM ( $\text{CIM} \geq 0,02 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante varias horas, para la mayoría de los microorganismos patógenos causantes de enfermedad en esta especie, teniendo en cuenta que la actividad antibacteriana del enrofloxacino se debe en parte a su metabolito, el ciprofloxacino (Prescott y Yielding, 1990; Haritova *et al.*, 2003).

Con lo que respecta al área bajo la curva de niveles plasmáticos (AUC) tras la administración intravenosa, los valores detallados por algunos de los autores anteriormente citados fueron 5,47  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  (Mengozzi *et al.*, 1996); 10,4  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  (Pozzin *et al.*, 1997); 8,98  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  (Bregante *et al.*, 1999); 9,42  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  (Elsheikh *et al.*, 2002); 4,19  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  (Haritova *et al.*, 2003) y 9,24  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  (Otero *et al.*, 2009). Como puede observarse, los valores de AUC remitidos por Haritova *et al.* (2003) son inferiores a los remitidos por el resto de autores. Lo mismo ocurre si comparamos los

datos de AUC tras la administración intramuscular. En el estudio farmacocinético llevado a cabo por Bermingham y Papich (2002) tras la administración intravenosa y oral, se señala un  $AUC_{0-\infty}$  tras la administración intravenosa (5 mg/kg) igual a 31,19  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  y un  $AUC_{0-\infty}$  tras la administración oral (10 mg/kg) de 30,58  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ . En este mismo estudio se puede observar un MAT de 897 min tras la administración oral. Bermingham y Papich (2002) consideraron el modelo bicompartimental abierto como el modelo más adecuado para el estudio farmacocinético del enrofloxacino tras la administración intravenosa. En el caso de la vía oral el modelo utilizado fue el monocompartimental.

Según Bermingham y Papich (2002), y al igual que Haritova *et al.* (2003), el modelo que mejor define la curva de concentración plasmática-tiempo es el bicompartimental abierto cuando la administración es intravenosa. Sin embargo, para el cálculo de ciertos parámetros farmacocinéticos se siguió un modelo no compartimental (MRT, Cl, AUC, F). Dicho modelo se utilizó, asimismo, cuando la vía seleccionada era la intramuscular.

Rahal *et al.* (2006) determinaron la farmacocinética del enrofloxacino tras la administración subcutánea. La biodisponibilidad fue relativamente baja (50,62%). La concentración máxima (0,66  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) fue alcanzada a los 120 min de la administración de una dosis de 5 mg/kg. El AUC y el AUMC (área bajo la curva del primer momento estadístico) calculados fueron respectivamente 8,78  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  y 113,9  $\mu\text{g}\cdot\text{h}^2/\text{ml}$ . El AUC obtenido es similar al obtenido por otros autores (Elsheikh *et al.*, 2002). Se observó un MAT de 480,6 min, así como, una vida media de absorción de 34,8 min y una constante de absorción de 1,48  $\text{h}^{-1}$ .

Recientemente, en 2009, Otero *et al.* determinaron la disponibilidad plasmática del enrofloxacino tras la administración de una dosis de 2,5 mg/kg por vía intravenosa. Dicha disponibilidad fue descrita siguiendo un modelo tricompartmental abierto con eliminación desde el compartimento central. Asimismo se llevó a cabo un análisis no compartimental para el cálculo de ciertos parámetros farmacocinéticos, obteniéndose valores de  $AUC_{0-t}$  8,37  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ ;  $AUC_{0-\infty}$  9,24  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ ;  $AUMC_{0-t}$  22,67  $\mu\text{g}\cdot\text{h}^2/\text{ml}$  y  $AUMC_{0-\infty}$  30,85  $\mu\text{g}\cdot\text{h}^2/\text{ml}$ . En este estudio se observó una conversión del enrofloxacino en ciprofloxacino del

26% ( $AUC_{\text{cipro}}/AUC_{\text{enro}} = 0,26$ ), alcanzándose la  $C_{\text{max}}$  del metabolito activo ( $0,26 \mu\text{g/ml}$ ) a los 94,2 min de la administración. Los valores de  $AUC_{0-t}$  y  $AUC_{0-\infty}$  obtenidos fueron 1,37 y  $2,40 \mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ , respectivamente.

En **cabras**, Rao *et al.* (2001) obtuvieron un valor de  $C_{\text{max}}$  para el enrofloxacino de  $1,13 \mu\text{g/ml}$ , alcanzado a los 48 min de la administración intramuscular de una dosis única de  $2,5 \text{ mg/kg}$  de enrofloxacino. Se puede observar que dichos valores son más elevados que los obtenidos por Mengozzi *et al.* (1996) en ganado ovino. El MAT y la constante de absorción calculados fueron de 34,2 min y  $2,5 \text{ h}^{-1}$  respectivamente. En un estudio posterior, en el cual se compara la farmacocinética del enrofloxacino tras la administración sola y en combinación con probenecid, los parámetros farmacocinéticos obtenidos tras una dosis de  $5 \text{ mg/kg}$  fueron los siguientes:  $C_{\text{max}} 2,80 \mu\text{g/ml}$  ( $t_{\text{max}}$ , 52,8 min);  $AUC 7,82 \mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ ;  $AUMC_{0-\infty} 18,64 \mu\text{g}\cdot\text{h}^2/\text{ml}$ ; MAT 16,8 min, siendo la constante de absorción  $2,55 \text{ h}^{-1}$  (Rao *et al.*, 2002a).

Elmas *et al.* (2001) observaron una  $C_{\text{max}}$  de  $3,25 \mu\text{g/ml}$  ( $t_{\text{max}}$ , 65,4 min) y un MAT de 15 min tras la administración intramuscular ( $5 \text{ mg/kg}$ ) y una concentración de  $9,24 \mu\text{g/ml}$  tras la administración intravenosa ( $5 \text{ mg/kg}$ ). Las concentraciones plasmáticas de enrofloxacino se mantienen altas durante varias horas, superando las CIM para muchos microorganismos patógenos, incluyendo *Mycoplasma spp.*

En 2002, Elsheikh *et al.* observaron una  $C_{\text{max}}$  de  $1,33 \mu\text{g/ml}$  ( $t_{\text{max}}$ , 111,13 min) tras la administración intramuscular de  $5 \text{ mg/kg}$ . Dichos parámetros farmacocinéticos resultaron superiores a los obtenidos por Mohammed en 2005 ( $C_{\text{max}}$ ,  $0,33 \mu\text{g/ml}$ ;  $t_{\text{max}}$ , 44,4 min). Más recientemente, en 2007, Ambros *et al.* obtuvieron una  $C_{\text{max}}$  de  $2,12 \mu\text{g/ml}$  ( $t_{\text{max}}$  76,2) tras la administración intramuscular de  $7,5 \text{ mg/kg}$  de fármaco.

El valor de AUC observado en los estudios publicados por Elmas *et al.* (2001), Elsheikh *et al.* (2002) y Ambros *et al.* (2007) y fue de 19,07; 7,55 y  $11,18 \mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$  respectivamente, tras la administración intramuscular ( $2,5$ ;  $5$  y  $7,5 \text{ mg/kg}$ ). Dichos valores resultaron superiores a los remitidos por Rao *et al.* en 2001 ( $2,09 \mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ ) y Mohammed en 2005 ( $2,29 \mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ ). En cuanto a la vía intravenosa los valores de AUC resultaron  $21,12 \mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$  (Elmas *et al.*, 2001);

7,72  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  (Elsheikh *et al.*, 2002); 1,92  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  (Rao *et al.*, 2002b); 2,23  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  (Mohammed, 2005) y 13,49  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  (Ambros *et al.*, 2007).

Señalar que la biodisponibilidad intramuscular del enrofloxacino en esta especie es más elevada que en el caso de la especie ovina, se habla de valores que oscilan entre el 90% (Elmas *et al.*, 2001), 98% (Elsheikh *et al.*, 2002) y más del 100% (Ambros *et al.*, 2007; Mohammed, 2005). Existen diferencias en cuanto al MAT publicado por los distintos autores. Así, tras la administración intramuscular de una dosis de 5 mg/kg se observaron valores de 36,63 min (Elsheikh *et al.*, 2002) y 9 min (Mohammed, 2005).

En cuanto a la vía subcutánea, Ramesh *et al.* (2002) propusieron el modelo no compartimental como el más adecuado para estudiar la farmacocinética del enrofloxacino tras la administración de una dosis de 7,5 mg/kg. La  $C_{\text{max}}$  (2,91  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) se alcanzó a los 174 min de la administración. El  $\text{AUC}_{0-\infty}$  y el  $\text{AUMC}_{0-\infty}$  obtenidos en este estudio fueron 19,35  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  y 114,54  $\mu\text{g}\cdot\text{h}^2/\text{ml}$ , respectivamente.

Ambros *et al.* (2007), determinaron el perfil farmacocinético no sólo del enrofloxacino sino también de su metabolito, el ciprofloxacino, tras la administración intravenosa e intramuscular de una dosis de 7,5 mg/kg. El modelo no compartimental fue elegido en el caso del ciprofloxacino, optándose por un modelo compartimental para el enrofloxacino (bicompartimental en el caso de la vía intravenosa y monocompartimental para la vía intramuscular). La concentración máxima para el metabolito (1,46  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) se alcanzó a los 60 min, siendo el AUC 5,74  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ . Tras la administración intramuscular se obtuvieron valores de  $C_{\text{max}}$ , 0,62  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ;  $t_{\text{max}}$ , 130,2 min y AUC 5,88  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ . Para ambas vías se observó una importante conversión de enrofloxacino en ciprofloxacino, como lo pone de manifiesto la relación entre las AUC ( $\text{AUC}_{\text{cipro}}/\text{AUC}_{\text{enro}} = 0,46$  y 0,59).

Por su parte, Rao *et al.* (2001) optaron por el modelo monocompartimental para la vía intramuscular. La concentración máxima ( $C_{\text{max}}$ , 0,24  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) alcanzada por el ciprofloxacino tras la administración de 2,5 mg/kg de enrofloxacino se obtuvo a los 72 min. El AUC calculado fue de 0,74  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ . En el caso de la vía intravenosa

el modelo seleccionado fue, asimismo, el monocompartimental. La  $C_{\max}$ ,  $t_{\max}$  y AUC fueron respectivamente 0,20  $\mu\text{g/ml}$ ; 57 min y 0,44  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ .

Puede observarse que las concentraciones plasmáticas máximas de ciprofloxacino alcanzadas en esta especie, tanto tras la administración intravenosa como intramuscular, son superiores a las alcanzadas en ganado ovino.

En **ganado vacuno** la absorción oral del enrofloxacino es escasa y bastante variable (aproximadamente del 10% al 50%) (Davidson *et al.*, 1986; Vancutsem *et al.*, 1990; Greene y Budsberg, 1993). Aunque los terneros pre-rumiantes presentan las mismas pautas de absorción oral que las especies monogástricas, se prefiere en ellos la administración parenteral. Si es necesaria la vía oral, debe considerarse que los minerales presentes en los sustitutivos lácteos pueden producir la quelación del antibacteriano (Vancutsem *et al.*, 1990; Sumano, 1993). Por otra parte, se ha podido observar una reducción temporal de la densidad, viabilidad y actividad de los protozoos del rumen, así como una ligera disminución del metabolismo ruminal, tras la administración oral de enrofloxacino (Sadiek, 1996).

En esta especie animal el enrofloxacino se absorbe bien por vía subcutánea, con una biodisponibilidad mayor al 90% (Richez *et al.*, 1994b; Kaartinen *et al.*, 1995; Martínez Larrañaga *et al.*, 1997; Mckellar *et al.*, 1997; Stegemann *et al.*, 1997). En un ensayo llevado a cabo por Kaartinen *et al.* (1995) se observó una biodisponibilidad del 82% después de la administración intramuscular y del 100% después de la administración subcutánea.

En el caso particular de vacas en lactación (Kaartinen *et al.*, 1995), se alcanzan concentraciones plasmáticas máximas similares tanto para la vía subcutánea como intramuscular dentro de los primeros 240 min. Así, tras la administración subcutánea, la  $C_{\max}$  (0,98  $\mu\text{g/ml}$ ) se alcanzó a los 192 min de su administración. En cuanto a la administración intramuscular, se obtuvo la  $C_{\max}$  (0,73  $\mu\text{g/ml}$ ) a los 144 min de la administración de una dosis de 5 mg/kg (Kaartinen *et al.*, 1995). La  $C_{\max}$  alcanzada por vía subcutánea en los estudios llevados a cabo por Richez *et al.* (1994b) fue similar a la obtenida por Kaartinen *et al.* (1995), con valores de 0,73  $\mu\text{g/ml}$ .

En el caso del ganado bovino adulto, tras la administración intravenosa, los valores de AUC son 7,42; 10,08; 5,28 y 4,42  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  (Kaartinen *et al.*, 1995; Richez *et al.*, 1994b; Bregante *et al.*, 1999; Varma *et al.*, 2003), respectivamente. El valor de AUC referido para la vía intramuscular es de 2  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  (Fu *et al.*, 2008).

Por su parte, y con respecto a la vía subcutánea, McKellar *et al.* (1999) señalaron una  $C_{\text{max}}$  de 0,242  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $t_{\text{max}}$ , 105 min), tras una dosis de 2,5 mg/kg en terneros de 10 a 12 meses. El AUC y AUMC calculados fueron 1,397  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  y 7,569  $\mu\text{g}\cdot\text{h}^2/\text{ml}$  respectivamente. En 2005, TerHune *et al.* obtuvieron valores de  $C_{\text{max}}$  de 0,81  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $t_{\text{max}}$ , 120 min) tras la administración subcutánea de 8 mg/kg en novillos. El AUC obtenido fue de 7,51  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ . Recientemente, Davis *et al.* (2007) incrementaron la dosis a 12,5 mg/kg obteniendo una  $C_{\text{max}}$  de 0,96  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $t_{\text{max}}$ , 288 min) y un AUC de 14,95  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ . No parece existir un incremento proporcional entre la dosis y la  $C_{\text{max}}$  alcanzada. Esto sugiere una cinética de absorción del fármaco no lineal a dosis altas, debido presumiblemente a una absorción más lenta y a un mayor depósito del fármaco cuando éste se administra a dosis elevadas, así lo refleja la  $t_{\text{max}}$  observada en los distintos estudios.

En 2003, Sharma *et al.* llevaron a cabo un estudio farmacocinético del enrofloxacin en terneros de búfalo tras la administración intravenosa e intramuscular. Para la vía intravenosa, el modelo cinético elegido fue el bicompartimental abierto, mientras que para la vía intramuscular el modelo que más se ajustaba era el monocompartimental. Los resultados obtenidos tras la administración intramuscular (5 mg/kg) muestran que tanto la  $C_{\text{max}}$  (0,49  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) como el  $t_{\text{max}}$  (51 min) son inferiores a los datos remitidos en ganado bovino.

En terneros la absorción es rápida, con una biodisponibilidad sistémica prácticamente completa, tanto por vía subcutánea como intramuscular. Richez *et al.* (1994b) observaron una biodisponibilidad del 97% después de la administración de 2,8 mg/kg de enrofloxacin por vía subcutánea. En este mismo estudio se detectó una  $C_{\text{max}}$  de 0,87  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

En cuanto al AUC, se puede observar que los valores obtenidos en terneros tras la administración intravenosa, son superiores a los obtenidos en los estudios

llevados a cabo en terneros de búfalo. Así, hablamos de 6,73  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  (Kaartinen *et al.*, 1997b) y 7,99  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  (Richez *et al.*, 1994b) para terneros y de 3,1  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  para terneros de búfalo (Sharma *et al.*, 2003). En este último estudio, llevado a cabo por Sharma *et al.* (2003) se indica un AUC tras la administración intramuscular de 3,8  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ .

Finalmente, señalar que en esta especie se ha detectado la presencia de enrofloxacino y ciprofloxacino en leche a los 15 min de la administración intravenosa de 2,5 mg/kg de enrofloxacino. El pico de concentración en leche para el enrofloxacino se alcanza entre los 42 y 78 min, mientras que para su metabolito, la concentración máxima se alcanza después de los 300-480 min de la administración. Las concentraciones de enrofloxacino encontradas en leche en esta especie animal son similares a las plasmáticas (Fichas técnicas de uso veterinario, Agencia Española del Medicamento, 2008).

En los **caballos**, donde otras fluoroquinolonas no han demostrado buena absorción por vía oral, el enrofloxacino muestra una biodisponibilidad de aproximadamente 60%, alcanzando concentraciones eficaces en plasma y tejidos. Estudios llevados a cabo por Giguère *et al.* (1996) en caballos adultos, demostraron una biodisponibilidad del 62,5% tras la administración de una dosis de 5 mg/kg, siendo la  $C_{\text{max}}$  alcanzada de 5,44  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . El valor de biodisponibilidad publicado por estos autores probablemente esté sobrevalorado, debido a que el estudio utilizaba un bioensayo que sobrestimaba la concentración de enrofloxacino en plasma.

Por otro lado, Bermingham *et al.* (2000) estudiaron la biodisponibilidad oral del enrofloxacino en potros, encontrando valores inferiores a los remitidos por Giguère *et al.* (1996) en animales adultos. Tras la administración de una dosis de 5 mg/kg, se obtuvo una biodisponibilidad del 42%. Al igual que la biodisponibilidad, la  $C_{\text{max}}$  alcanzada en estos animales también fue inferior, estableciéndose en 2,2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

En el año 2000, Haines *et al.* realizaron un estudio farmacocinético del enrofloxacino en yeguas, obteniendo una biodisponibilidad del 78,3% tras la administración intragástrica de una dosis de 7,5 mg/kg de enrofloxacino. La

concentración máxima ( $C_{\max}$ , 1,85  $\mu\text{g/ml}$ ) se alcanzó a los 45 minutos de la administración. El AUC fue de 16,30  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ , y se corresponde con el publicado previamente por Langston *et al.* en 1997 (12,04  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ ) y Zehl en 1989 (18,94  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ ). Sin embargo, difiere del publicado por Giguère *et al.* en 1996 (35,62  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ ).

Con respecto a la vía intramuscular, la biodisponibilidad observada en animales adultos después de la administración de una dosis de 5 mg/kg fue del 100%, siendo la  $C_{\max}$  de 1,28  $\mu\text{g/ml}$ .

En cuanto a los valores de AUC tras la administración intravenosa, se pueden observar valores uniformes en los estudios llevados a cabo por Zehl (1989), Kaartinen *et al.* (1997a) y Haines *et al.* (2000), siendo estos 23,24; 19,5 y 21,03  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$  respectivamente. No obstante, estos valores no se corresponden con los observados en otros estudios, 13,2  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$  (Pyörälä *et al.*, 1994); 58,3  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$  (Giguère *et al.*, 1996) y 48,54  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$  (Birmingham *et al.*, 2000).

En **cerdos** la biodisponibilidad del fármaco es alta, tanto en aquellos animales sometidos a ayuno (100%) como, en los que reciben alimento en el momento de la administración del fármaco (83%) (Gyrd-hansen y Nielsen, 1994; Nielsen, 1997; Fichas técnicas de uso veterinario, Agencia Española del Medicamento, 2008). Tras la administración oral, y dentro de las primeras horas (2 a 4 horas), se alcanzan concentraciones séricas y tisulares por encima de la CIM para muchos microorganismos patógenos importantes en esta especie (Banholzer *et al.*, 1997; Richez *et al.*, 1997a). Así, una dosis oral de 10 mg/kg asegura concentraciones plasmáticas terapéuticamente eficaces durante 24 horas.

En cuanto a la administración de enrofloxacino por vía intramuscular, tanto Richez *et al.* (1997a) como Pijpers *et al.* (1997) comprobaron que la administración de 2,5 mg/kg daba lugar a una  $C_{\max}$  que oscilaba entre los 0,61 y 0,75  $\mu\text{g/ml}$ , alcanzada a los 135 min. La administración del fármaco por esta vía permite una rápida absorción, con una biodisponibilidad elevada. Los estudios llevados a cabo por Richez *et al.* (1997a) mostraron una biodisponibilidad del 95%, frente al 100% demostrado por los estudios de Pijpers *et al.* (1997) y Zeng y Fung (1997).

Tras la administración intravenosa de 2,5 mg/kg, los valores obtenidos para el AUC fueron los siguientes 5,03; 5,97 y 9,94  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  (Richez *et al.*, 1997a; Pijpers *et al.*, 1997; Zeng y Fung, 1997).

En **perros** el enrofloxacino es rápidamente absorbido por vía oral, sin embargo sobre la biodisponibilidad hay cierto desacuerdo entre los autores. Algunos como Cester *et al.* (1996) y Bidgood y Papich (2005) refieren biodisponibilidades del 72,3 y 63,2%, mientras que otros como Monlouis *et al.* (1997) o Küng *et al.* (1993) hablan de biodisponibilidades del 83% y del 100% respectivamente. Heinen (2002) obtuvo en sus estudios una  $C_{\text{max}}$  de 1,41  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $t_{\text{max}}$ , 109,8 min) tras la administración oral de una dosis de 5 mg/kg. La  $C_{\text{max}}$  obtenida se corresponde con la publicada por los autores Küng *et al.* en 1993 (1,16  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); Cester *et al.* en 1996 (1,12  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); Cester y Toutain en 1997 ( $C_{\text{max}}$  1,12  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ;  $t_{\text{max}}$ , 111,6 min); Monlouis *et al.* en 1997 ( $C_{\text{max}}$  1,44  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ;  $t_{\text{max}}$ , 108 min) y Bidgood y Papich en 2005 ( $C_{\text{max}}$ , 1,24  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ;  $t_{\text{max}}$ , 56,4 min) tras la administración de 5 mg/kg, sin embargo resulta inferior a la publicada por Walker *et al.* en 1992 (2,45  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y Frazier *et al.* (2000) ( $C_{\text{max}}$ , 1,75  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ;  $t_{\text{max}}$ , 72,6 min) tras la administración de 5,5 y 5 mg/kg, respectivamente.

Bidgood y Papich (2005) estudiaron la farmacocinética del enrofloxacino y de su metabolito activo tras la administración oral de 5 mg/kg en perros sanos. El modelo cinético elegido por estos autores fue el no compartimental. Los valores de AUC obtenidos en este estudio se reflejan a continuación:  $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$  4,45  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ ;  $\text{AUC}_{0-\infty}$  4,46  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  y  $\text{AUMC}_{0-\infty}$  18,36  $\mu\text{g}\cdot\text{h}^2/\text{ml}$ . El  $\text{AUC}_{0-\infty}$  es similar al indicado anteriormente por Küng *et al.* (1993) (3,90  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ ) y Cester y Toutain (1997) (5,34  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ ).

Los valores de AUC hallados por los distintos autores tras la administración intravenosa de 5 mg/kg son 16,32; 3,9; 4,05-4,34; 7,27; 8,15 y 8,2  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  (Walker *et al.*, 1992; Küng *et al.*, 1993; Intorre *et al.*, 1995; Cester *et al.*, 1996; Stegemann *et al.*, 1996; Monlouis *et al.*, 1997).

El enrofloxacinó también es bien absorbido por vía oral en **gatos**, con una biodisponibilidad de casi el 100% y una  $C_{max}$  de 1,66  $\mu\text{g/ml}$  ( $t_{max}$ , 36 min) tras la administración de 5 mg/kg. El AUC fue de 7,2  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$  (Richez *et al.*, 1997b).

Recientemente, Lucas *et al.* (2008) llevaron a cabo un estudio en el cual comparaban los perfiles farmacocinéticos de dos formulaciones de enrofloxacinó (5% y 10%) tras la administración de una dosis de 5 mg/kg por vía subcutánea. El modelo farmacocinético elegido y que mejor definía la curva concentración plasmática-tiempo fue el no compartimental. La  $C_{max}$  obtenida para ambas formulaciones fue muy similar; 0,73  $\mu\text{g/ml}$  ( $t_{max}$ , 72,6 min) para formulación al 5% y 0,60  $\mu\text{g/ml}$  ( $t_{max}$ , 82,8 min) para la formulación al 10%, ocurriendo lo mismo para el resto de los parámetros farmacocinéticos determinados. Formulación al 5%:  $AUC_{0-t}$  3,09  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ ;  $AUC_{0-\infty}$  3,34  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ . Formulación al 10%:  $AUC_{0-t}$  2,93  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ ;  $AUC_{0-\infty}$  3,19  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ .

En **conejos** la biodisponibilidad del fármaco es variable en función de la vía de administración, así representa el 77% para la vía subcutánea, el 90-92% para la vía intramuscular (Cabanés *et al.*, 1992; Elmas *et al.*, 2007) y el 61% para la vía oral (Broome *et al.*, 1991b). Con respecto a la vía oral, los estudios llevados a cabo por Broome *et al.* (1991b) mostraron una  $C_{max}$  de 0,45  $\mu\text{g/ml}$  a los 138 min de la administración de una dosis de 5 mg/kg. En el caso de la vía intramuscular la  $C_{max}$  alcanzada para la misma dosis osciló entre 1,4  $\mu\text{g/ml}$  ( $t_{max}$ , 38 min) (Elmas *et al.*, 2002); 1,9  $\mu\text{g/ml}$  ( $t_{max}$ , 25 min) (Elmas *et al.*, 2007) y 3,04  $\mu\text{g/ml}$  (Broome *et al.*, 1991b; Cabanés *et al.*, 1992).

Los valores de AUC obtenidos en los distintos estudios realizados en esta especie, tras la administración intravenosa, resultan muy similares entre sí; 5,38 y 5,52  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$  (Aramayona *et al.*, 1996; Bregante *et al.*, 1999) tras la administración de una dosis de 7,5 mg/kg y 8,6; 3,89 y 3,2  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$  (Broome *et al.*, 1991b; Cabanés *et al.*, 1992; Elmas *et al.*, 2007) tras una dosis de 5 mg/kg. Para la vía intramuscular se han obtenido valores de AUC de 2,7  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$  (Elmas *et al.*, 2007) y 5,4  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$  (Elmas *et al.*, 2002).

En **aves**, se ha publicado que la absorción oral del enrofloxacino es buena, alcanzándose niveles efectivos al añadir el fármaco al agua de bebida (Flammer, 1998).

Estudios llevados a cabo en pollos por Knoll *et al.* en 1999 revelaron una biodisponibilidad oral del 89,2% después de la administración oral de una dosis de 10 mg/kg de enrofloxacino. Este dato se asemeja al obtenido por Bugyei *et al.* (1999) (80,1%) en pollos y Haritova *et al.* (2004) (87,94%) en gallos y gallinas. Sin embargo, estos resultados no se corresponden con los obtenidos por Anadón *et al.* en 1995 (64%), Abd-el Aziz *et al.* en 1997 (59,6%) y Dimitrova *et al.* en 2007 (69,2%), que encontraron valores mucho más bajos. La  $C_{max}$  indicada por Anadón *et al.* (1995) en sus estudios fue de 2,44  $\mu\text{g/ml}$  ( $t_{max}$  98,4 min) tras la administración de una dosis de 10 mg/kg, mientras que en el caso de Knoll *et al.* (1999) la  $C_{max}$  alcanzada no superó los 1,88  $\mu\text{g/ml}$ , tras la administración de la misma dosis. En el caso de los estudios publicados por Bugyei *et al.* (1999) la  $C_{max}$  fue bastante inferior a la reflejada por Anadón *et al.*, (1995), probablemente, debido a la diferencia en cuanto a la dosis administrada (5 mg/kg (Bugyei *et al.*, 1999) vs 10 mg/kg (Anadón *et al.*, 1995). Así, la  $C_{max}$  obtenida fue de 0,99  $\mu\text{g/ml}$  ( $t_{max}$ , 150 min), resultando significativamente inferior a la observada tras la administración intramuscular de la misma dosis. Sin embargo, los valores de  $C_{max}$  obtenidos por Bugyei *et al.* (1999) tras la administración oral, se corresponden con los publicados posteriormente por Sumano *et al.* (2001 y 2003) (1,09 y 1,30  $\mu\text{g/ml}$ ) y Dimitrova *et al.* (2007) ( $C_{max}$ , 1,23  $\mu\text{g/ml}$ ;  $t_{max}$ , 379,8 min) en pollos y pavos respectivamente.

El AUC obtenido para la vía oral fue de 17,4 y 18,11  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$  (Bugyei *et al.*, 1999; Dimitrova *et al.*, 2007). Para la administración intramuscular e intravenosa de 5 mg/kg, se obtuvieron valores de AUC significativamente superiores a los observados tras la administración oral (21,4  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$  y 21,7  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$  respectivamente). Si se comparan los valores de AUC tras la administración intravenosa, publicados por Bugyei *et al.* (1999) con los indicados por otros autores (Anadón *et al.*, 1995; Knoll *et al.*, 1999) pueden observarse diferencias evidentes (34,51 y 16,17  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ ). Sin embargo, se corresponden con los valores señalados por Dimitrova *et al.* en 2007 (25,91  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ ).

En el caso particular de los pollos de engorde, la  $C_{\max}$  alcanzada tras la administración intramuscular de 5 mg/kg de enrofloxacino fue de 2,10  $\mu\text{g/ml}$  ( $t_{\max}$ , 47,4 min) (Bugyei *et al.*, 1999). El valor de  $t_{\max}$  es similar al señalado por otros autores en años anteriores (Sheer, 1987; Flammer *et al.*, 1991). Este estudio reveló además, una biodisponibilidad intramuscular elevada, en torno al 98,6% y un tiempo de semivida absorción ( $t_{1/2a}$ ) de 25,2 min (constante de absorción  $2,10 \text{ h}^{-1}$ ) (Bugyei *et al.*, 1999).

Con respecto a los estudios llevados a cabo en **peces** y, tras la administración intravenosa de 10 mg/kg el AUC varió entre 109,2 y 171,3  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$  (Lewbart *et al.*, 1997). Estudios realizados por Stoffregen *et al.* (1993) en salmón atlántico muestran una biodisponibilidad oral del 46% y una biodisponibilidad intraperitoneal del 89%, alcanzándose una  $C_{\max}$  de 0,29-0,54  $\mu\text{g/ml}$  tras la administración oral de 10 mg/kg. Dicha concentración es algo inferior a la indicada por Lewbart *et al.* (1997) en sus estudios en pacú, donde la  $C_{\max}$  alcanzada fue de 0,8  $\mu\text{g/ml}$  tras la administración de 5 mg/kg. En el caso de la vía intramuscular y tras la administración de la misma dosis (5mg/kg) la  $C_{\max}$  fue de 1,64  $\mu\text{g/ml}$  y el AUC de 46,3  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ .

Estudios llevados a cabo en **camellos** señalan que el enrofloxacino presenta, al igual que en la mayoría de las especies anteriormente citadas, una biodisponibilidad elevada (85%) tras la administración intramuscular de 2,5 mg/kg. La  $C_{\max}$  alcanzada fue de 1,44  $\mu\text{g/ml}$ . El AUC calculado tras la administración intravenosa de la misma dosis fue 18,95  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$  (Gavrielli *et al.*, 1995).

El AUC observado en estudios llevados a cabo con **ratones** es de 2,45  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ , resultando inferior al señalado en **ratas** (5,65  $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ ). La dosis media de enrofloxacino utilizada en estos animales fue de 7,5 mg/kg (Bregante *et al.*, 1999).

En el caso de **animales exóticos**, como el varano de la sabana, especie de lagarto nativo de África (*Varanus exanthematicus*), la  $C_{\max}$  alcanzada tras la administración oral de 10 mg/kg de enrofloxacino fue de 3,6  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que tras la administración intramuscular de la misma dosis, la  $C_{\max}$  fue de 10,5  $\mu\text{g/ml}$  (Hungerford *et al.*, 1997). Los estudios llevados a cabo en pintones birmanas (*Python molurus bivittatus*) por Young *et al.* (1997) indican una  $C_{\max}$  de enrofloxacino de

1,66 µg/ml tras la administración intramuscular de 5 mg/kg. Por otra parte, Helmick *et al.* (2004) señalaron que tras la administración oral e intravenosa de 5 mg/kg de enrofloxacino en el caiman americano (*Alligator mississippiensis*), las concentraciones plasmáticas se ajustaban a un modelo bicompartimental abierto tras la administración intravenosa, sin embargo por vía oral no se ajustaban a ningún modelo, por lo que utilizaron la cinética no compartimental. La  $C_{max}$  obtenida por vía oral fue de 0,50 µg/ml. Finalmente, y en el caso de tortugas estrella indias (*Geochelone elegans*) se obtuvo una  $C_{max}$  de 3,59 µg/ml ( $t_{max}$ , 30 min) tras una dosis de 5mg/kg por vía intramuscular (Raphael *et al.*, 1994).

## 9.2. DISTRIBUCIÓN

En la mayoría de las especies animales el volumen de distribución de las fluoroquinolonas es grande, superando 1 l/kg (Lode *et al.*, 1998; Aminimanizani *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 2006) y es mucho mayor que el alcanzado por otros antibióticos, tales como, los β-lactámicos y aminoglucósidos (Brown, 1996).

Se ha visto que se alcanzan concentraciones elevadas en saliva y secreción nasal; en mucosa, epitelio y secreciones bronquiales; en cámaras anterior y posterior del ojo, así como en el hígado, tracto urinario y tejido prostático. Penetran bien en el tejido pulmonar, fluido de revestimiento pulmonar, macrófagos alveolares y leucocitos polimorfonucleares, alcanzando concentraciones superiores a las séricas (Wolfson y Hooper, 1989; Wise, 1991; Wolfson y Hooper, 1991; McKellar *et al.*, 1999). Sin embargo, no ocurre lo mismo al hablar de las concentraciones de estos fármacos en el líquido cefalorraquídeo (atravesan parcialmente la barrera hematoencefálica), o en los huesos, donde son menores a las presentes en plasma, aunque suficientes para superar las concentraciones mínimas inhibitorias de la mayoría de las bacterias sensibles (Petri, 2003). Las fluoroquinolonas son de los pocos fármacos que penetran adecuadamente en la próstata en concentraciones suficientes como para tratar una infección. En un estudio llevado a cabo por Dorfman *et al.* (1995) se puede observar que la concentración de enrofloxacino (determinado por bioensayo) en el fluido y tejido prostático excede la concentración sérica en todo

momento tras la administración. Además, estos fármacos atraviesan la placenta y se concentran en el líquido amniótico (Azanza *et al.*, 2003).

Varias fluoroquinolonas (entre ellas el enrofloxacino) llegan con rapidez a la glándula mamaria y se distribuyen ampliamente por el tejido mamario (Ziv *et al.*, 1990; Sumano, 1993). Este hecho es importante debido a que la mastitis es un problema muy importante en la producción lechera bovina, ovina y caprina, no solo por las pérdidas económicas que provoca a los productores, sino también desde el punto de vista de seguridad e higiene de los alimentos producidos para consumo humano.

Las fluoroquinolonas penetran y alcanzan concentraciones intracelulares muy elevadas tanto en las células fagocíticas como en las no fagocíticas, presentando una gran actividad intracelular frente a un amplio rango de microorganismos (Ballesta *et al.*, 1996; Brown, 1996; García *et al.*, 1996; Pascual y García, 1998; García *et al.*, 2000). Se ha demostrado que la fagocitosis y la muerte intracelular de *E.coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* es estimulada por el ciprofloxacino (Wetzstein y De Jong, 1996).

En **ganado ovino**, Mengozzi *et al.* (1996) observaron que el enrofloxacino administrado por vía intramuscular tenía una buena distribución, mostrando un volumen de distribución elevado. El volumen de distribución ( $V_a$ ) para la vía intravenosa fue de 2,18 l/kg. En cuanto, al volumen de distribución en estado estacionario ( $V_{d_{ss}}$ ), se observaron valores muy similares tanto para la vía intramuscular como intravenosa, siendo de 3,03 y 3,02 l/kg respectivamente. En este mismo estudio se determinó el  $V_{d_{ss}}$  para el ciprofloxacino tras la administración intravenosa e intramuscular de 2,5 mg/kg de enrofloxacino (3,26 y 3,79 l /kg respectivamente). Al determinar el MRT (tiempo de residencia medio) del ciprofloxacino, se observaron diferencias significativas (MRT vía intravenosa = 501 min y MRT vía intramuscular = 1017 min).

Los estudios llevados a cabo por Haritova *et al.* en 2003, revelan volúmenes de distribución ( $V_a$  2,91 l/kg;  $V_{d_{ss}}$  2,82 l/kg) elevados y muy similares a los publicados por Mengozzi *et al.* (1996) ( $V_a$  2,18 l/kg;  $V_{d_{ss}}$  3,02 l/kg) tras la

administración intravenosa. Dichos valores revelan una buena penetración del enrofloxacino a través de las membranas biológicas, llegando con facilidad a los tejidos. Este hecho fue confirmado en el estudio farmacocinético comparativo entre ganado ovino y caprino llevado a cabo por Elsheikh *et al.* (2002). En él pueden observarse grandes volúmenes de distribución ( $V_a$  2,5 l/kg;  $V_{d_{ss}}$  2,27 l/kg;  $V_c$  0,76 l/kg en ovejas y  $V_a$  2,21 l/kg;  $V_{d_{ss}}$  1,94 l/kg;  $V_c$  1,13 l/kg en cabras) tras la administración intravenosa.

Por su parte, Haritova *et al.* (2003) encontraron que los volúmenes de distribución en el compartimento central ( $V_c$ ) y periférico ( $V_p$ ), tras la administración intravenosa de 2,5 mg/kg, eran 1,35 y 1,43 l/kg respectivamente. La constante de distribución hacia el compartimento periférico ( $k_{12}$ ) se situó en  $4,77 \text{ h}^{-1}$ , y la de retorno ( $k_{21}$ ) en  $4,08 \text{ h}^{-1}$ . Como puede observarse, la tasa de transferencia de enrofloxacino del compartimento central al periférico y viceversa es casi igual.

En 1997, Pozzin *et al.* llevaron a cabo un estudio farmacocinético con enrofloxacino por vía intravenosa, intramuscular y oral, llegando a la conclusión de que las áreas bajo las curvas concentración-tiempo (AUC) eran similares para la administración intravenosa e intramuscular pero reducidas para la vía oral. El volumen de distribución obtenido tras la administración intravenosa fue de 1,3 l/kg, resultando inferior al obtenido por Mengozzi *et al.* (1996) pero muy similar al publicado por Bregante *et al.* en 1999 (1,53 l/kg).

Bermingham y Papich (2002) revelaron volúmenes de distribución tras la administración intravenosa de 5 mg/kg de enrofloxacino, de 1,15 l/kg ( $V_a$ ) y 0,97 l/kg ( $V_{d_{ss}}$ ).

Al igual que los autores anteriores, Rahal *et al.* (2006) también indicaron que el modelo bicompartimental abierto era el que mejor se ajustaba a la concentración plasmática frente al tiempo tras la administración de 5 mg/kg por vía intravenosa, los volúmenes de distribución obtenidos fueron los siguientes;  $V_a = 2,94 \text{ l/kg}$ ;  $V_{d_{ss}} = 2,70 \text{ l/kg}$ ;  $V_c = 1,38 \text{ l/kg}$  y  $V_p = 1,33 \text{ l/kg}$ . Para la vía subcutánea se optó por el modelo monocompartimental como el más adecuado. El volumen de distribución elevado (2,97 l/kg) indica una adecuada penetración tisular del enrofloxacino tras la

administración por esta vía. Este hecho se ve respaldado por su bajo Cl, su alto MRT (673,8 min) y su larga semivida de eliminación.

Las diferencias existentes en los estudios anteriormente citados en cuanto al Vd y Cl (como veremos en el apartado de excreción) podrían ser debidas, según afirman los autores implicados, a las diferencias en el estado fisiológico de los animales empleados en el estudio. Mientras que Mengozzi *et al.* (1996) y Haritova *et al.* (2003) desarrollaron sus estudios en ganado ovino lactante, Bregante *et al.* (1999) y Otero *et al.* (2000) llevaron a cabo sus estudios en ovinos no lactantes. Este hecho, junto con los datos farmacocinéticos recogidos, permiten a los autores señalar que la lactación induce cambios en la distribución y eliminación del enrofloxacin.

Por otra parte, Otero *et al.* (2009) propusieron el modelo tricompartmental como el más adecuado para definir la farmacocinética del enrofloxacin tras la administración intravenosa. La  $k_{12}$  ( $5,16 \text{ h}^{-1}$ ) y  $k_{21}$  ( $5,41 \text{ h}^{-1}$ ) obtenidas indican una buena y rápida distribución del enrofloxacin hacia el compartimento periférico superficial. La distribución hacia el compartimento periférico profundo es más lenta y viene definida por los valores de  $k_{13}$  ( $0,67 \text{ h}^{-1}$ ) y  $k_{31}$  ( $0,35 \text{ h}^{-1}$ ). Los volúmenes de distribución obtenidos; volumen del compartimento central 0,29 l/kg; volumen de compartimento periférico superficial 0,27 l/kg; volumen del compartimento periférico profundo 0,55 l/kg y  $V_{ss}$  1,10 l/kg indican, al igual que en otras especies animales (cabra: Elmas *et al.*, 2001; Rao *et al.*, 2002a y b; cerdos: Anadón *et al.*, 1999; camellos: Gavrielli *et al.*, 1995), una buena distribución y penetración del enrofloxacin en tejidos y membranas.

Con respecto al MRT (tiempo de residencia medio) y tras la administración intravenosa de enrofloxacin, se obtuvieron diferentes valores: 321,6 min (Mengozzi *et al.*, 1996); 300 min (Birmingham y Papich, 2002); 288,6 min (Haritova *et al.*, 2003); 205,8 min (Rahal *et al.*, 2006) y 181,2 min (Otero *et al.*, 2009). En el caso de la administración intramuscular, los datos de MRT obtenidos fueron de 313,8; 307,88 y 271,2 min (Mengozzi *et al.* 1996; Elsheikh *et al.* 2002; Haritova *et al.* 2003) tras la administración de una dosis de 2,5 mg/kg en el caso de los dos primeros y de 5 mg/kg para el último. Se refleja, además, un MRT igual a 1168,2 min tras la

administración oral de 10 mg/kg (Birmingham y Papich, 2002). En el caso de la administración subcutánea, el MRT observado fue de 673,8 min (Rahal *et al.*, 2006).

El tiempo de residencia medio en leche, tras la administración 2,5 mg/kg por vía intravenosa, fue de 504 min. Tras la administración intramuscular de la misma dosis de fármaco el MRT fue igual a 628,2 min (Haritova *et al.*, 2003).

Por lo que respecta al **ganado caprino**, Rao *et al.* (2001) determinaron que tras la administración intramuscular de 2,5 mg/kg de enrofloxacino el volumen de distribución ( $V_a$ ) era de 1,42 l/kg, siendo de 1,52 l/kg tras la administración de 5 mg/kg (Rao *et al.*, 2002a). Este elevado volumen de distribución indica que el enrofloxacino se distribuye, al igual que en otras especies, ampliamente por todo el organismo, penetrando tanto en tejidos como fluidos. Para realizar el estudio farmacocinético del enrofloxacino tras la administración por esta vía, se utilizó el modelo monocompartimental. Dicho modelo fue elegido también por Ramesh *et al.* (2002), para definir la farmacocinética del enrofloxaino tras la administración subcutánea de 7,5 mg/kg. El valor de  $V_{ss}/F$  fue igual a 2,48 l/kg, lo que indica asimismo una buena penetración en tejidos y fluidos corporales.

En el caso de la vía intravenosa se optó por el modelo bicompartimental abierto. El  $V_a$ ,  $V_{d_{ss}}$  y el  $V_c$  calculados fueron respectivamente 1,38 l/kg, 1,276 y 0,773 l/kg (Rao *et al.*, 2002b).

Elmas *et al.* (2001) propusieron, por su parte, el modelo bicompartimental abierto como el más adecuado para definir la farmacocinética del enrofloxacino tras la administración intravenosa e intramuscular en cabras. El volumen de distribución en estado estacionario ( $V_{d_{ss}}$ ) osciló entre 1,06 y 1,51 l/kg tras la administración intravenosa de 5 mg/kg de enrofloxacino. Por vía intramuscular el  $V_{d_{ss}}$  fue de 1,51 l/kg.

El modelo bicompartimental abierto también fue elegido por Elsheikh *et al.* (2002) para definir el comportamiento del fármaco tras la administración intravenosa de 5 mg/kg. Los volúmenes de distribución obtenidos fueron;  $V_a = 2,21$ ;  $V_{d_{ss}} = 1,94$  y  $V_c = 1,13$ . En el caso de la vía intramuscular se optó por el modelo no compartimental.

Mohammed (2005) propuso, al igual que el resto de autores ya citados, el modelo bicompartimental abierto como el más adecuado para definir las curvas de concentración plasmática-tiempo del enrofloxacino tras su administración intravenosa en cabras. Los volúmenes de distribución encontrados por este autor fueron elevados ( $V_a = 3,8$  l/kg,  $V_{d_{ss}} = 3.1$  l/kg y  $V_c = 1,5$  l/kg), lo que pone de manifiesto la amplia distribución tisular del enrofloxacino y su acumulación en los tejidos. La constante de distribución hacia el compartimento periférico ( $k_{12}$ ) fue  $0,60 \text{ h}^{-1}$ , y la de retorno,  $k_{21}$ ,  $0,63 \text{ h}^{-1}$ , siendo la relación  $k_{12}/k_{21}$  igual 1. Esta relación indica que el fármaco se mueve rápidamente del líquido extracelular al intracelular, y viceversa. Señalar que, en 2007, Ambros *et al.* publicaron un  $V_a$  algo inferior a los referidos anteriormente ( $V_a = 0,77$  l/kg tras la administración de una dosis de  $7,5 \text{ mg/kg}$  por vía intravenosa).

Con respecto al MRT, existe cierta disparidad en los resultados obtenidos por los diversos autores. Así, Rao *et al.* (2001; 2002a) hablan de un tiempo medio de residencia de  $58,26$  min para la vía intravenosa y de  $92,4$  min ( $2,5 \text{ mg/kg}$ ) y  $142,2$  min ( $5 \text{ mg/kg}$ ) para la vía intramuscular, mientras que Elmas *et al.* (2001) y Elsheikh *et al.* (2002) hablan de un MRT de  $345$  y  $280,20$  min respectivamente. En el caso de la vía intravenosa el valor del MRT calculado por Elmas *et al.* (2001) fue de  $247,8$  min, existiendo diferencias significativas al compararlo con el valor obtenido tras la administración intramuscular. El valor de MRT remitido por Mohammed (2005) tras una dosis de  $5 \text{ mg/kg}$  fue de  $324$  min, valor similar al obtenido por Elmas *et al.* (2001). Con respecto a la vía subcutánea, se refieren valores de  $344,4$  min tras la administración de una dosis de  $7,5 \text{ mg/kg}$  (Ramesh *et al.*, 2002).

El MRT calculado para el ciprofloxacino resultó de  $427,8$  y  $696,6$  min tras la administración intravenosa e intramuscular respectivamente. Rao *et al.* (2001) obtuvieron un tiempo de residencia medio de  $163,8$  y  $115,8$  min tras la administración de una dosis de  $2,5 \text{ mg/kg}$  vía intramuscular e intravenosa.

En **bovinos** los estudios farmacocinéticos demostraron, al igual que en el ganado ovino y caprino, que el enrofloxacino es rápida y ampliamente distribuido en todo el organismo, con una excelente disponibilidad sistémica y una tasa de

eliminación relativamente baja. La concentración plasmática media supera ampliamente las CIM para los microorganismos patógenos más frecuentes aislados en esta especie (Otero *et al.*, 2001b).

Kaartinen *et al.* (1995) obtuvieron un volumen de distribución ( $V_a$ ) de 1,63 l/kg tras la administración intravenosa de enrofloxacino en vacas lactantes. Este valor es muy similar al remitido por Richez *et al.* (1994b) para el ganado vacuno adulto, 1,65 l/kg. Los estudios llevados a cabo por Malbe *et al.* (1996) y Bregante *et al.* (1999) mostraron volúmenes de distribución de 2,1 l/kg y 2,98 l/kg respectivamente.

Varma *et al.* (2003) propusieron el modelo bicompartimental abierto como el más adecuado para definir las curvas de concentración plasmática-tiempo del enrofloxacino tras su administración intravenosa (5 mg/kg) en bovinos. El volumen de distribución ( $V_a$ ) observado por estos autores es superior al remitido en los estudios anteriores. Así,  $V_a = 4,1$  l/kg;  $V_{d_{ss}} = 0,45$  l/kg y  $V_c = 2,12$  l/kg. El tiempo de residencia medio fue de 208,8 min.

El volumen de distribución más bajo observado en vacas lactantes es el que se encuentra tras la administración intramuscular de enrofloxacino. En este caso el  $V_a$  no supera los 0,6 l/kg (Kaartinen *et al.*, 1994). Sin embargo, en 2008, Fu *et al.* determinaron un volumen de distribución, tras la administración intramuscular de una dosis de 2,5 mg/kg, de 2,98 l/kg. dicho valor se corresponde al observado en otras especies animales (ovino, Mengozzi *et al.*, 1996; caprino, Elmas *et al.*, 2001; Rao *et al.*, 2002a y b).

Richez *et al.* (1994b) y Kaartinen *et al.* (1997b) estudiaron el volumen de distribución del enrofloxacino tras la administración intravenosa en terneros a distintas edades, obteniendo valores de 1,70 l/kg para terneros de un día, 2,61 l/kg para terneros de una semana y 1,98 l/kg para terneros adultos.

En el caso de terneros de búfalo se observa una constante de distribución alta ( $0,11 \text{ min}^{-1}$ ) relacionada con una vida media de distribución corta (7,73 min) tras la administración de 5 mg/kg de enrofloxacino vía intravenosa. Para esta vía el volumen de distribución ( $V_a$ ) calculado fue de 7,38 l/kg y el tiempo de residencia

medio de 233,54 min. En el caso de la vía intramuscular, el volumen de distribución calculado fue 10,63 l/kg. El MRT, la constante de distribución y vida media de distribución fueron 378,5 min,  $0,217 \text{ min}^{-1}$  y 4,05 min respectivamente.

Con lo que respecta al MRT, se observaron valores de 478,8 min tras la administración intramuscular y de 504 y 331,3 min tras la administración subcutánea (Kartinen *et al.*, 1995; McKellar *et al.*, 1999). En cuanto a la vía intravenosa, Malbe *et al.* (1996) refieren un valor de MRT igual a 256,8 min.

En terneros, por ejemplo, se demostró la presencia del principio activo en todos los tejidos y fluidos muestreados, hallándose concentraciones superiores a las séricas (a los 60 min y después de 240 min) en pulmón, riñón, hígado, corazón, nódulos linfáticos y pared intestinal. A las 12 horas de la administración del fármaco, las concentraciones en los distintos tejidos aún permanecían más elevadas que las concentraciones séricas, mostrándose los valores más altos en bilis y orina. En hígado, riñones, corazón, pulmón y bazo las concentraciones fueron inferiores, obteniéndose los valores más bajos en cerebro (Scheer, 1987b).

En **caballos**, se ha observado que después de administraciones intragástricas repetidas se alcanzan concentraciones superiores a las plasmáticas en hígado, riñón, bazo, líquido sinovial y orina (170 a 830 veces mayores que las presentes en plasma). Por otra parte, se pueden observar concentraciones similares o levemente superiores a las del plasma en músculo, piel, corazón, pulmón, estómago, intestino, vejiga, glándula mamaria y útero. Las concentraciones en líquido peritoneal son significativamente menores que las concentraciones séricas, siendo las concentraciones a nivel de cerebro, cristalino, humor vítreo y humor acuoso del 10 al 20% de las presentes en plasma (Giguère *et al.*, 1996; Giguère y Bélanger, 1997).

Los estudios llevados a cabo por Giguère *et al.* (1996) en équidos adultos revelaron un volumen de distribución ( $V_a$ ) de 0,78 l/kg después de la administración intravenosa de 5 mg/kg de enrofloxacin. Dicho valor difiere del obtenido un par de años atrás por Pyörälä *et al.* (1994). En este caso se obtuvo un volumen de distribución de 2,4 l/kg. En los estudios llevados a cabo por Haines *et al.* (2000) se pueden observar valores de  $V_a$  y  $V_{d_{ss}}$ , tras la administración intravenosa de

7,5 mg/kg de enrofloxacino, de 2,93 y 2,46 l/kg respectivamente. El MRT calculado para esta vía se situó en 393 min, siendo de 868,8 min para la vía intragástrica (IG). En el caso de la vía IG, el  $V_a$  es igual a 7,71 l/kg siendo el  $V_{d_{ss}}$  igual a 7,28 l/kg.

En potros tenemos como valor de referencia de volumen de distribución, el publicado por Bermingham *et al.* en el año 2000. El volumen de distribución ( $V_a$ ) obtenido tras la administración intravenosa de una dosis de 5 mg/kg de enrofloxacino fue de 2,31 l/kg.

En **cerdos** el enrofloxacino se distribuye ampliamente, presentando una completa disposición después de la administración intramuscular (Pijpers *et al.*, 1997). Se detectaron niveles elevados de enrofloxacino en mucosa nasal, septo nasal, pulmones, tejido linfático, músculo, hígado y pared intestinal (Scheer, 1987b; Ganière *et al.*, 1997).

Pijpers *et al.* (1997) obtuvieron un volumen de distribución muy similar al obtenido por Richez *et al.* (1997a) en esta especie después de la administración intravenosa: 3,95 l/kg y 3,5 l/kg respectivamente. Dichos valores coinciden con los referidos por Zeng y Fung (1997) (3,34 l/kg).

En el estudio llevado a cabo por Richez *et al.* (1997a) el  $V_{ss}$  fue 2,66 l/kg tras la administración intravenosa y el MRT de 585 min tras la administración de una dosis de 2,5 mg/kg fue. El MRT para la vía intramuscular (2,5 mg/kg) fue 1149,6 min.

Los estudios llevados a cabo en **perros** y **gatos** revelaron una amplia distribución y penetración del enrofloxacino en los distintos tejidos, alcanzándose concentraciones tisulares mayores a las plasmáticas y por encima de la CIM para los patógenos más comunes en estas especies animales.

En el caso particular de la especie canina, Monlouis *et al.* (1997) y Küng *et al.* (1993) señalaron un  $V_a$  de 4,5 l/kg tras la administración intravenosa. Este valor se asemeja al obtenido por Stegemann *et al.* en 1996 (4,2 l/kg). Cabe señalar que el volumen de distribución obtenido por Intorre *et al.* (1995) fue algo superior a

los valores referidos anteriormente, oscilando entre 5 y 5,6 l/kg. El valor más bajo de  $V_a$ , lo obtuvo Cester *et al.* (1996) (2,5 l/kg).

El volumen de distribución en estado estacionario ( $V_{d_{ss}}$ ) aportado por Monlouis *et al.* (1997) fue de 2,6 l/kg para la vía oral y de 3,7 l/kg para la vía intravenosa. Los  $V_{ss}$  obtenidos por Küng *et al.* (1993) y Cester *et al.* (1996) fueron 7 y 2,35 l/kg, respectivamente.

En el caso de los felinos domésticos, el volumen de distribución del enrofloxacino es superior al visto anteriormente en la especie canina. Los estudios llevados a cabo por Richez *et al.* (1997b) mostraron un volumen de distribución de 6,3 l/kg, siendo el volumen de distribución en estado estacionario de 4 l/kg para la vía intravenosa y de 3,1 l/kg para la vía oral.

En cuanto al MRT, también fue mayor en la especie felina que en la canina. Así los valores de MRT en perro son de 270; 396 y 225 min (vía oral) (Monlouis *et al.*, 1997; Heinen, 2002; Bidgood y Papich, 2005) y 324 min (vía intravenosa) (Monlouis *et al.*, 1997), mientras que para el gato son de 522 min (vía oral) y 516 min (vía intravenosa) respectivamente (Richez *et al.*, 1997b), a una dosis de 5 mg/kg, valores menores (238,2 y 262,8 min) fueron obtenidos por Lucas *et al.* (2008) tras la administración subcutánea de 5mg/kg de enrofloxacino al 5 y 10%, respectivamente.

En **conejos** el enrofloxacino presenta una distribución tisular elevada, incluyendo la leche. Es por este motivo, que se debe tener especial cuidado en la administración de este fármaco en conejas lactantes (Mitchell, 2006). El volumen de distribución varía según los distintos autores entre 2,12; 4,40; 3,97; 4,40 y 4,80 l/kg tras la administración intravenosa (Broome *et al.*, 1991b; Cabanes *et al.*, 1992; Aramayona *et al.*, 1996; Bregante *et al.*, 1999; Elmas *et al.*, 2007). Como puede observarse, y al igual que ocurre en otras especies animales, el volumen de distribución es muy elevado, lo que indica una buena penetración tisular (característico de las fluoroquinolonas) y hace del enrofloxacino un antibacteriano de elección en infecciones tisulares.

Aramayona *et al.* (1996) obtuvieron un valor para el  $V_c$  de 1,53 l/kg, siendo la vida media de distribución de 31 min (dosis 7,5 mg/kg, vía intravenosa).

En 2002, Elmas *et al.* propusieron el modelo bicompartimental abierto como el modelo más adecuado para estudiar la farmacocinética del enrofloxacino tras la administración intramuscular de 5 mg/kg. El volumen de distribución ( $V_{ss}$ ) obtenido en este estudio (3 l/kg) es similar al publicado previamente por Cabanes *et al.* (1992) (2,9 l/kg) tras la administración de la misma dosis. En cuanto a las constantes de distribución, se obtuvieron valores de  $k_{12}$ , 0,126 h<sup>-1</sup> y  $k_{21}$ , 0,413 h<sup>-1</sup>. Puede observarse que la tasa de transferencia del compartimento central al periférico es mayor que la del periférico al central. El MRT fue de 192 min.

Por su parte, y con lo que respecta a la vía oral, Broome *et al.* (1991b) señalaron un tiempo de residencia medio de 507,6 min.

Finalmente señalar que en **pollos** y **pavos** el enrofloxacino presenta, al igual que en las especies anteriormente descritas una buena distribución y penetración tisular. Su buena penetración tisular, viene evidenciada por el hecho de que los niveles de enrofloxacino alcanzados en hígado, riñón, corazón, pulmones, bazo y músculo, son más elevados que los niveles séricos.

Knoll *et al.* (1999) llevaron a cabo estudios farmacocinéticos del enrofloxacino en pollos, observando un volumen de distribución ( $V_a$ ) de 5 l/kg para la vía intravenosa. Dicho valor se asemeja al obtenido por Anadón *et al.* en 1995 (4,3 l/kg), siendo el volumen de distribución en estado estacionario ( $V_{d_{ss}}$ ) de 4,41 l/kg para la vía oral y de 2,77 l/kg para la vía intravenosa. En este mismo estudio se calculó el MRT, estableciéndose en 579 min para la administración intravenosa y en 918 min para la oral. Los datos referidos por Anadón *et al.* (1995) respecto a la vía intravenosa, son similares a los obtenidos por Bugyei *et al.* (1999) (750 min); García Ovando *et al.* (1999) (614,4 min); Soliman (2000) (403,2 min) y Dimitrova *et al.* (2007) (537,6 min). En el caso de la administración oral, el MRT calculado por Anadón *et al.* (1995) es similar al obtenido por Bugyei *et al.* (1999) (822 min) y Dimitrova *et al.* (2007) (714,6 min), no obstante difiere del obtenido por Knoll *et al.* (1999) (456 min). El MRT, calculado tras la administración intramuscular de una dosis de 5 mg/kg se situó en 750 min (Bugyei *et al.*, 1999).

Bugyei *et al.* (1999) obtuvieron un  $V_a$  de 3,82 y 3,79 l/kg tras la administración de 5 mg/kg por vía intravenosa e intramuscular respectivamente. En cuanto al  $V_{d_{ss}}$  se observaron valores de 2,92; 2,82 y 2,52 l/kg para las vías intravenosa, intramuscular y oral. El volumen de distribución en el compartimento central ( $V_c$ ), tras la administración intravenosa fue de 2,2 l/kg.

Al igual que otros autores, Bugyei *et al.* (1999) optaron por el modelo bicompartimental abierto y por el no compartimental para estudiar los parámetros farmacocinéticos del enrofloxacinó tras la administración intravenosa. La vida media de distribución calculada para esta vía fue de 21,6 min (constante de distribución  $1,84 \text{ h}^{-1}$ ), mientras que para la vía intramuscular fue de 127,8 min (constante de distribución  $0,48 \text{ h}^{-1}$ ).

Con lo que respecta a otras especies, tales como **ratas, ratones, camellos y peces** los volúmenes de distribución ( $V_a$ ) observados en los distintos estudios realizados, tras la administración intravenosa, fueron 4,78; 10,5; 1,4; 2,56 y 3 l/kg respectivamente (Gavrielli *et al.*, 1995; Lewbart *et al.*, 1997; Bregante *et al.*, 1999).

### 9.2.1. Unión a proteínas plasmáticas

La unión a proteínas del enrofloxacinó es generalmente baja (Mitchell, 2006), aunque hay una falta de coincidencia entre los resultados obtenidos por diferentes autores para las mismas especies animales, hecho que probablemente se deba a las distintas técnicas utilizadas en los estudios (Papich y Riviere, 2003).

En el caso del ganado bovino y ovino, el porcentaje de unión a las proteínas plasmáticas oscila entre el 36 y el 45% (vacas lactantes 35-45%, Kaartinen *et al.*, 1995; bovino 46%, Davis *et al.*, 2007). Sin embargo, se han señalado datos de unión a proteínas más elevados, concretamente de un 56% para ganado bovino (Bregante *et al.*, 1999) y del 60% para el ganado ovino (Nouws *et al.*, 1988; Villa *et al.*, 1997). El porcentaje de unión es bajo para los camellos, équidos y suídos, siendo del 17-24%; 22% y 27% respectivamente (Nouws *et al.*, 1988; Gavrielli *et al.*, 1995; Villa *et al.*, 1997; Papich *et al.*, 2002). Lo mismo ocurre en el caso de los pollos, donde el

porcentaje de unión no supera el 24% (Bugyei *et al.*, 1999). En cuanto al perro, se pueden observar valores muy dispares al comparar unos estudios con otros, así algunos autores remiten porcentajes que oscilan entre el 15 y 35% (Bidgood y Papich, 2005) mientras que otros hablan incluso un 72% de unión a proteínas plasmáticas (Villa *et al.*, 1997). Finalmente, y con respecto a los conejos, el porcentaje de unión es variable según los distintos estudios (35-53%) (Aramayona *et al.*, 1994; Papich y Riviere, 2003).

### **9.3. METABOLISMO**

Las fluoroquinolonas son eliminadas del organismo principalmente por metabolismo hepático y excreción renal (Vancutsem *et al.*, 1990; Dudley, 1991). Por lo general son parcialmente metabolizadas en el hígado y excretadas en bilis (el porcentaje de eliminación varía entre especies) y orina a altas concentraciones de fármaco activo (fármaco inalterado o metabolito activo).

Las rutas metabólicas comunes de estos agentes son la N-desalquilación, conjugación con el ácido glucurónico, oxidación, sulfoxidación, acetilación y ruptura del anillo piperacínico. Estas reacciones se llevan a cabo principalmente por el sistema del citocromo p-450 (Bergogne-Berezin, 2002). El grado de metabolismo varía entre especies y se sitúa en torno al 40%.

El enrofloxacino se metaboliza parcialmente en ciprofloxacino, el cual es responsable de una considerable parte de la actividad antibacteriana (Tyczkowska *et al.*, 1989; Giguère *et al.*, 1996; Otero *et al.*, 2001a). El metabolismo se lleva a cabo en el hígado, y posiblemente en otros sitios como la ubre (Malbe *et al.*, 1996) o los macrófagos (Hawkins *et al.*, 1998). El efecto de primer paso hepático es bajo, aproximadamente del 7% (Ganière *et al.*, 1997).

La biotransformación del enrofloxacino en ciprofloxacino se produce por eliminación del grupo etilo del anillo piperacínico (reacción de metabolización en fase I). Posteriormente se producen otros productos de la metabolización del ciprofloxacino (se han identificado cuatro metabolitos), pero son de importancia

menor y no contribuyen a los efectos antibacterianos (Vancutsem *et al.*, 1990; Papich y Riviere, 2003; Mitchell, 2006).

Como veremos a continuación, las concentraciones plasmáticas de ciprofloxacino con respecto al fármaco madre (enrofloxacino) varían en función de la especie animal.

En un estudio realizado por Mengozzi *et al.* (1996) en **ganado ovino**, se refiere que la concentración de ciprofloxacino alcanza el 35-55% de la concentración sérica total del enrofloxacino, tras la administración de 2,5 mg/kg por vía intravenosa e intramuscular respectivamente. En 2009, Otero *et al.* obtuvieron un porcentaje de conversión de enrofloxacino en ciprofloxacino del 26% tras la administración de 2,5 mg/kg por vía intravenosa. Los datos obtenidos en ganado ovino se corresponden con los obtenidos por Ambros *et al.* (2007) en **ganado caprino**. Sin embargo, debe señalarse que el porcentaje de metabolización del enrofloxacino en ciprofloxacino remitido por Rao *et al.* (2001 y 2002a) en sus estudios, tras la administración intravenosa ( $AUC_{\text{cipro}}/AUC_{\text{enr}} 0,24$ ) e intramuscular ( $AUC_{\text{cipro}}/AUC_{\text{enr}} 0,36$ ;  $AUC_{\text{cipro}}/AUC_{\text{enr}} 0,34$ ) en cabras es inferior al obtenido en ovejas, no superando el 36%.

Bermingham y Papich (2002), señalan que en ovinos, el porcentaje de metabolización del enrofloxacino en ciprofloxacino es mucho menor al remitido por los autores anteriores, no superando el 3,1 % para la vía intravenosa. En el caso de la vía oral el porcentaje de metabolización fue del 11,8 %. La concentración máxima alcanzada por el ciprofloxacino no supera, en ninguno de los casos, los 0,20 µg/ml, contribuyendo así de forma minoritaria a la actividad antimicrobiana total del enrofloxacino.

En el ganado **bovino**, la concentración de ciprofloxacino es el 30-35% de la concentración sérica de enrofloxacino durante la fase de eliminación, y tras la administración de 5 mg/kg por vía intravenosa. Para la vía intramuscular y tras la administración de 2,5 mg/kg se han obtenido valores de hasta el 55,5% (Fu *et al.*, 2008) En **terneros** podemos hablar aproximadamente de un 25-30%. (Richez *et al.*,

1994b; Kaartinen *et al.*, 1997b; Malbe *et al.*, 1996). Dichos valores se corresponden con los obtenidos por Sharma *et al.* (2003) en terneros de búfalo (27%).

Con respecto a los **équidos**, la concentración de ciprofloxacino respecto a la de enrofloxacino oscila entre el 20 y el 35%, si hablamos de équidos adultos. En el caso particular de los **potros**, así como, en **cerdos** y algunos **reptiles** la cantidad de ciprofloxacino medida es insignificante (Richez *et al.*, 1997a; Zeng y Fung, 1997; Bermingham *et al.*, 2000).

El examen de la magnitud de la metabolización del enrofloxacino en ciprofloxacino en **perros y gatos** se recoge en varios estudios (Küng *et al.*, 1993; Cester *et al.*, 1996; Cester y Toutain (1997); Heinen, 1997; Kordick *et al.*, 1997; Monlouis *et al.*, 1997; Richez *et al.*, 1997b; Boothe *et al.*, 2002; Papich y Riviere, 2003; Albarellos *et al.*, 2004). Un análisis de los datos muestra que cuando se alcanza la  $C_{max}$ , el ciprofloxacino constituye, respectivamente, el 20% en perros (pudiendo alcanzar hasta un 40%) y el 10% en gatos, de la concentración total de fluoroquinolona.

Los estudios en **peces** muestran que tras la administración de enrofloxacino, aproximadamente el 2% de la  $C_{max}$  está constituida por ciprofloxacino (Lewbart *et al.*, 1997).

Finalmente, los estudios llevados a cabo en **pollos** muestran que las concentraciones de ciprofloxacino en plasma y tejido tras la administración de enrofloxacino son mínimas (Anadón *et al.*, 1995; Knoll *et al.*, 1999). Anadón *et al.* (1995) indicaron que la proporción de concentraciones tisulares ciprofloxacino:enrofloxacino era mayor que 1 tras la administración de enrofloxacino, independientemente de las bajas concentraciones plasmáticas del ciprofloxacino. Tras 12 días de la administración todavía se observaba ciprofloxacino en los tejidos.

Para concluir, se debe tener en cuenta que si se producen metabolitos activos, como en el caso del enrofloxacino, puede conducir a errores en la interpretación de los ensayos farmacológicos cuando se utiliza un bioensayo (ensayo microbiológico), porque no permiten distinguir el fármaco de origen del metabolito activo. Los

estudios farmacocinéticos llevados a cabo por Cester *et al.* en 1996 comparan los bioensayos con los métodos de HPLC, demostrado que los primeros sobreestiman las concentraciones combinadas de enrofloxacino y ciprofloxacino en animales hasta en un 70% para el AUC y 29% para la  $C_{max}$ . Dichos resultados concuerdan con los publicados por Küng *et al.* en 1993 (Papich y Riviere, 2003).

#### 9.4. EXCRECIÓN

Las fluoroquinolonas, pueden ser clasificadas en tres grupos según su principal mecanismo de eliminación. Así, podemos encontrarnos con fluoroquinolonas que únicamente se excretan por vía renal (tal es el caso del enrofloxacino, orbifloxacino, ofloxacino, temafloxacino y lomefloxacino) o por metabolismo hepática (difloxacino y perfloxacino) y otras, que por el contrario utilizan tanto el mecanismo renal como hepático (marbofloxacino, danofloxacino, norfloxacino, enoxacino y ciprofloxacino) (Martínez *et al.*, 2006). La mayoría de las quinolonas y fluoroquinolonas se eliminan por vía renal, esto hace que se encuentren en altas concentraciones, y que una de sus primeras indicaciones terapéuticas fuera el tratamiento de las infecciones urinarias. La vía biliar también contribuye parcialmente a la eliminación de algunas quinolonas, como el perfloxacino, norfloxacino y ciprofloxacino.

La excreción renal del enrofloxacino se produce mediante filtración glomerular y también mediante secreción tubular activa a través de la bomba de aniones orgánicos (Brown, 1996; Bregante *et al.*, 1999). La filtración glomerular y la secreción tubular activa permiten alcanzar concentraciones urinarias elevadas. La saturación del proceso de secreción tubular podría ser responsable de la no linealidad del proceso de eliminación a altas dosis que señalan algunos autores. De hecho, la secreción tubular de la mayor parte de las fluoroquinolonas resulta bloqueada por el probenecid. El papel de la excreción tubular se demostró tras comprobar que la probenecida hacía disminuir el aclaramiento de algunas fluoroquinolonas (Mckellar, 1996).

En el caso de la mayoría de los compuestos de este grupo, la mayor parte del fármaco original y/o sus metabolitos se recuperan en la orina y sólo una pequeña cantidad en las heces. La difloxacina constituye una excepción a esta afirmación. Estudios llevados a cabo en perros de la raza Beagle, demostraron que el 80% de la dosis de difloxacina administrada por vía intravenosa se recuperaba en las heces y que el aclaramiento renal suponía menos del 5% del aclaramiento sistémico total.

Nos encontramos también con una eliminación transepitelial a través de la pared gastrointestinal, lo que genera altas concentraciones en sitios de colonización de bacterias patógenas, que indudablemente contribuye a la alta eficacia de estos antibacterianos en las enteritis bacterianas (Mckellar, 1996). Algunas de las fluoroquinolonas sufren circulación enterohepática, encontrándose en las heces en concentraciones elevadas (Brown, 1996; Azanza *et al.*, 2003).

También pueden ser eliminadas por leche, por lo que se deben evitar durante la lactancia, o en su caso, si se trata de animales destinados a la producción láctea, se debe tener en cuenta los tiempos de espera (Azanza *et al.*, 2003).

En **ganado ovinos**, la semivida de eliminación ( $t_{1/2\beta}$ ) oscila entre 150 y 286,2 min. Así, tras la administración oral de 2,5 mg/kg se observa una vida media de 228 min. Dicho valor se corresponde con el obtenido tras la administración de la misma dosis por vía intramuscular (219; 214,2; 211,85 y 231,6 min) (Pozzin *et al.*, 1997; Otero *et al.*, 2000; Elsheikh *et al.*, 2002; Haritova *et al.*, 2003). En el caso de la vía intravenosa, los valores para la vida media obtenidos por Mengozzi *et al.* (1996), Pozzin *et al.* (1997), Elsheikh *et al.* (2002) y Haritova *et al.* (2003) son también similares (223; 228; 195,59; 198). El valor publicado por Bermingham y Papich en 2002 (286 min) es algo superior a los anteriores, siendo el remitido por Bregante *et al.* en 1999 (150 min); Otero *et al.* en el año 2000 (141 min); Rahal *et al.* en 2006 (156 min) y recientemente, Otero *et al.* en 2009 (127,2 min) inferiores. Para la vía subcutánea la vida media fue de 427,2 min (constante de eliminación  $0,12 \text{ h}^{-1}$ ) (Rahal *et al.*, 2006).

En cuanto al aclaramiento (Cl), Bregante *et al.* (1999), Bermingham y Papich (2002) y Otero *et al.* (2009) obtuvieron valores de 4,60; 3,37 y 4,83 ml/min·kg tras la

administración intravenosa. Dichos valores resultan inferiores a los publicados por Mengozzi *et al.* en 1996 (9,17 ml/min·kg); Elsheikh *et al.* en 2002 (8,86 ml/min·kg); Haritova *et al.* en 2003 (10,05 ml/min·kg) y Rahal *et al.* en 2006 (14,33 ml/min·kg). Para la vía intramuscular el CI obtenido por Mengozzi *et al.* (1996) resultó 10,33 ml/min·kg, siendo similar al obtenido tras la administración intravenosa. Las constantes de eliminación calculadas tras la administración intravenosa e intramuscular resultaron muy similares entre sí (0,21 y 0,2 h<sup>-1</sup>).

Por su parte, el ciprofloxacino muestra una vida media de eliminación, tras la administración de una dosis de 2,5 mg/kg de enrofloxacino, de 247,8 min para vía intravenosa y de 598,8 min para la intramuscular. En el caso de la administración intravenosa la constante de eliminación fue de 0,27 h<sup>-1</sup> y el CI de 53,83 ml/min·kg, obteniéndose para la vía intramuscular una constante de eliminación de 0,11 h<sup>-1</sup> y el CI de 23,16 ml/min·kg.

Haritova *et al.* (2003) determinaron parámetros farmacocinéticos del enrofloxacino en leche tras la administración tanto intravenosa como intramuscular. Así, tras la administración intravenosa, comprobaron concentraciones elevadas de enrofloxacino en leche durante más de 24 horas (0,135 µg/ml). Dichas concentraciones son eficaces frente a la mayoría de los microorganismos patógenos causantes de mastitis en el ganado ovino (*Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma agalactiae*, *Micrococcus* spp, *Streptococcus* spp). La C<sub>max</sub> alcanzada fue 2,38 µg/ml (t<sub>max</sub>, 240 min). El AUC fue igual a 23,76 µg·h/ml, mientras que el coeficiente AUC<sub>leche</sub>/AUC<sub>sueros</sub> se estableció en 5,62. Como puede observarse, al comparar las concentraciones de enrofloxacino en leche y suero, estas son mayores en leche y lo mismo ocurre tras la administración intramuscular. Esta disposición del fármaco en leche fue ya previamente indicada por otros autores, Kaartinen *et al.* (1995) en vacas lactantes y Amer *et al.* (2000) en cabras lactantes. En el caso de la administración intramuscular, puede observarse una concentración máxima de enrofloxacino inferior a la obtenida tras la administración intravenosa, alcanzada a un tiempo algo más tardío (C<sub>max</sub>, 1,94 µg/ml; t<sub>max</sub>, 280,2 min). Sin embargo, las concentraciones a lo largo del tiempo son muy similares a las obtenidas por vía intramuscular, siendo, por lo tanto, eficaces frente a los microorganismos patógenos causantes de enfermedad.

Los valores de AUC y  $AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{siero}}$  fueron respectivamente 24,81  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$  y 8,15. El coeficiente  $AUC_{\text{leche}}/AUC_{\text{siero}}$  tanto para la administración intravenosa como intramuscular, indica una buena penetración del enrofloxacino en leche.

En cuanto a la semivida de eliminación del enrofloxacino tras la administración intramuscular en **ganado caprino**, se han obtenido resultados dispares. Rao *et al.* (2001) hablan de valores en torno a 44,4 min (constante de eliminación,  $0,95\text{ h}^{-1}$ ) tras una dosis de 2,5 mg/kg. Al administrar una dosis superior (5mg/kg) la semivida fue de 83,4 min (constante de eliminación,  $0,54\text{ h}^{-1}$ ) (Rao *et al.*, 2002a). Por su parte, Ambros *et al.* (2007) obtuvieron una  $t_{1/2\beta}$ , tras una dosis de 7,5 mg/kg de 158,4 min. La  $t_{1/2\beta}$  del enrofloxacino tras la administración de 5mg/kg fue según Elmas *et al.* (2001) de 282 min; Elsheikh *et al.* (2002) de 157,27 min y Mohammed (2005) de 264,6 min. La  $t_{1/2\beta}$  para la vía intravenosa se sitúa entre los 100,8 min y los 79,8 min tras la administración de una dosis de 5 mg/kg y 7,5 mg/kg respectivamente (Kaartinen *et al.*, 1995; Ambros *et al.*, 2007). Por su parte, Elmas *et al.* (2001); Elsheikh *et al.* (2002) y Mohammed (2005) refieren valores de  $t_{1/2\beta}$  para la vía intravenosa de 240; 163,76 y 282 min, tras una dosis de 5 mg/kg. Rao *et al.* (2001) obtuvieron un  $t_{1/2\beta}$  de 43,8 min tras la administración de una dosis de 2,5 mg/kg. La semivida de eliminación, tras la administración subcutánea de 7,5 mg/kg de enrofloxacino fue de 170,4 min (Ramesh *et al.*, 2002).

En cuanto a la semivida de eliminación del metabolito activo del enrofloxacino, el ciprofloxacino, se obtuvieron valores de 333 y 510,6 min tras la administración de una dosis de 7,5 mg/kg vía intravenosa e intramuscular respectivamente (Ambros *et al.*, 2007). Tras la administración intramuscular de 2,5 mg/kg la vida media fue de 82,8 min (constante de eliminación,  $0,53\text{ h}^{-1}$ ). En el caso de la vía intravenosa se situó en 55,2 min (constante de eliminación,  $0,823\text{ h}^{-1}$ ).

Los estudios llevados a cabo por Elsheikh *et al.* (2002) señalan un aclaramiento (Cl) tras la administración intravenosa, de 11,72 ml/min·kg, dicho valor resulta inferior al reportado por Rao *et al.* (2002b) (22,2 ml/min·kg) y El-Sooud (2003) (27,83 ml/min·kg), pero superior al remitido por Elmas *et al.* (2001) (4 ml/min·kg). En el caso de la vía intramuscular los valores de Cl obtenidos por los

distintos autores fueron 4,3; 22,2 y 13,38 ml/min·kg (Elmas *et al.*, 2001; Rao *et al.*, 2001; Rao *et al.*, 2002a).

En **bovinos**, Kaartinen *et al.* (1995); TerHune *et al.* (2005) y Davis *et al.* (2007) refieren semividas de eliminación tras la administración subcutánea de 5 y 8 mg/kg similares: 333; 436,8 y 407,4 min, respectivamente. Tras la inyección intravenosa de la misma dosis (5 mg/kg), la semivida osciló entre 100,8 min (Kaartinen *et al.*, 1995); 65,4 min (Malbe *et al.*, 1996); 138 min (Richez *et al.*, 1994b); 169,2 min (Bregante *et al.*, 1999) y 156,6 min (constante de eliminación  $0,282 \text{ h}^{-1}$ ) (Varma *et al.*, 2003), mientras que para la inyección intramuscular fue de 354 min (Kaartinen *et al.*, 1995). Dicho valor es similar al obtenido por Sharma *et al.* en 2003 (337,7 min; constante de eliminación  $0,002 \text{ min}^{-1}$ ), en terneros búfalo.

Los estudios llevados a cabo en terneros por Richez *et al.* (1994b) muestran que el  $t_{1/2\beta}$  tras la administración subcutánea e intravenosa es de 132 min, resultando inferior a los valores obtenidos en terneros de un día (396,6 min) y terneros de una semana (292,2 min), valores obtenidos tras la administración intravenosa de una dosis de 2,5 mg/kg (Kaartinen *et al.*, 1997b). Si comparamos los estudios llevados a cabo en terneros bovinos (Davidson *et al.*, 1986) y en terneros de búfalo (Sharma *et al.*, 2003), podemos observar que la semivida del enrofloxacin para la vía intravenosa es similar. Hablamos de 162 min para terneros bovinos y 172,2 min ( $k_e 0,004 \text{ min}^{-1}$ ) para terneros de búfalo. En cuanto al aclaramiento (Cl), los resultados obtenidos en búfalos (27,80 ml/kg·min) tras la administración intravenosa (5 mg/kg) resultan similares a los obtenidos en ganado bovino (21 y 19,06 ml/kg·min) (Malbe *et al.*, 1996; Varma *et al.*, 2003). El Cl calculado en búfalos, tras la administración intramuscular (22,25 ml/kg·min) resultó muy similar al obtenido tras la administración intravenosa, y al obtenido por Fu *et al.* en 2008 tras la administración intramuscular (20,8 ml/kg·min).

Con lo que respecta a la **especie equina**, se han llevado a cabo estudios en équidos adultos, yeguas y potros. El valor de semivida de eliminación observado fue respectivamente 306 y 465 min para équidos adultos (Giguère *et al.*, 1996; Langston *et al.*, 1997); 637,2 min (constante de eliminación  $0,07 \text{ h}^{-1}$ ) para yeguas (Haines *et al.*, 2000) y 990 min para potros (Birmingham *et al.*, 2000) tras la administración

oral de una dosis de 5 mg/kg en el caso de équidos adultos y potros y de una dosis de 7,5 mg/kg vía IG, en el caso de las yeguas.

El valor de la semivida obtenido tras la administración intramuscular de enrofloxacino fue de 594 min, siendo para la vía intravenosa (5 mg/kg) de 264 min (Pyörälä *et al.*, 1994). Dicho valor resulta algo inferior al señalado por otros autores tras la administración intravenosa: 389,4; 330; 360 y 319,8 min (Zehl, 1989; Ensink *et al.*, 1993; Giguère *et al.*, 1996; Haines *et al.*, 2000).

Haines *et al.* (2000) publicaron valores de aclaramiento (Cl) de 6,16 ml/kg·min tras la administración intravenosa y de 8,16 ml/kg·min tras la administración intragástrica de 7,5 mg/kg de enrofloxacino en yeguas.

En cuanto a la semivida de eliminación tras la administración intramuscular en **cerdos**, se han obtenido resultados poco uniformes. Así, Anadón *et al.* (1999) y Richez *et al.* (1994a) muestran valores de 723,6 y 787,2 min respectivamente, mientras que Zeng y Fung obtuvieron valores muy inferiores (243,6 min). En el caso de la vía intravenosa, los valores obtenidos tras la administración de una dosis de 2,5 mg/kg, resultan más uniformes, oscilando entre 330 y 463,8 min (Pijpers *et al.*, 1997; Richez *et al.*, 1997a; Zeng y Fung, 1997).

En **perros**, la  $t_{1/2\beta}$  del enrofloxacino tras la administración oral de 5 mg/kg, oscila entre 240; 144; 133,8; 162; 276,6 y 256 min (Walker *et al.*, 1992; Küng *et al.*, 1993; Cester y Toutain, 1997; Monlouis *et al.*, 1997; Frazier *et al.*, 2000; Heinen, 2002). Puede observarse que los valores aportados por Walker *et al.* (1992); Frazier *et al.* (2000) y Heinen (2002) son superiores a los remitidos por el resto de los autores. En el caso de la vía intravenosa, los distintos estudios revelan los siguientes valores: 126; 144; 162-180 y 151,2 min (Greene y Budsberg, 1993; Küng *et al.*, 1993, Intorre *et al.*, 1995; Cester *et al.*, 1996). Como puede observarse, resultan semejantes aunque inferiores a los obtenidos por Stegemann *et al.* en 1996 tras la administración de una dosis de 5 mg/kg (288 min).

En el caso de los **gatos**, el valor de semivida de eliminación tras la administración oral es de 372 min, mientras que para la administración intravenosa

es de 402 min (Richez *et al.*, 1997b). En cuanto a la vía subcutánea se indican valores de 140,4 y 155,4 min tras una dosis de 2,5 mg/kg (Lucas *et al.*, 2008).

Broome *et al.* (1991b) señalaron un valor de  $t_{1/2\beta}$  tras la administración oral de 144,6 min y de 109,2 min tras la administración intramuscular en **conejos**. El valor obtenido por estos autores tras la administración intramuscular, es similar al obtenido posteriormente por Elmas *et al.* en 2002 (180 min) y en 2007 (144 min). Los valores obtenidos tras la administración intravenosa de enrofloxacino resultan muy similares entre sí: 150; 130,8; 112,2; 132 y 180 min (Broome *et al.*, 1991b; Cabanes *et al.*, 1992; Aramayona *et al.*, 1996; Bregante *et al.*, 1999; Elmas *et al.*, 2007). Con respecto al aclaramiento (Cl) y tras la administración intravenosa, Aramayona *et al.* (1996) y Elmas *et al.* (2007) refieren valores de 23,9 y 28,3 ml/kg·min, respectivamente, mientras que Broome *et al.* (1991b) aportan un valor inferior, 10 ml/kg·min. En cuanto a los valores de Cl para la vía intramuscular, se indican valores de 15 ml/kg·min (Elmas *et al.*, 2002) y 21,7 ml/kg·min (Cabanes *et al.*, 1992).

Por su parte, Aramayona *et al.* (1996) obtuvieron un valor de semivida de eliminación del enrofloxacino en leche de 73 min, tras la administración intravenosa de 7,5 mg/kg de fármaco.

Aramayona *et al.* (1996) estudiaron, asimismo, la excreción del enrofloxacino en leche, observando que tras la administración de una dosis de 7,5 mg/kg por vía intravenosa se alcanzaba una concentración máxima en leche de 8,5 µg/ml ( $t_{max}$ , 15-30 min).

En **aves**, la  $t_{1/2\beta}$  del enrofloxacino para la vía oral oscila entre 853,8; 257; 348 y 415,2 min (Anadón *et al.*, 1995; Abd-el Aziz *et al.*, 1997; Knoll *et al.*, 1999; Dimitrova *et al.*, 2007) tras la administración de una dosis de 10 mg/kg. La semivida de eliminación calculada en los distintos estudios, es mayor para los pavos que para los pollos (Abd-el Aziz *et al.*, 1997; Knoll *et al.*, 1999; Sumano *et al.*, 2001 y 2003). Las posibles causas de este hecho pueden estar en las diferentes condiciones experimentales, en las peculiaridades de la raza, así como en las diferencias de peso de los animales (Dimitrova *et al.*, 2007).

En el caso de la vía intravenosa (10 mg/kg), el valor obtenido en los distintos estudios es bastante variable. Los valores aportados por Anadón *et al.* (1995) y Bugyei *et al.* (1999) resultan similares entre sí (617,4 y 657,6 min respectivamente), así como los datos remitidos por otros autores como Geene y Budsberg en 1993 (438 min), García Ovando *et al.* en 1997 (419,4 min), Knoll *et al.* en 1999 (336 min) y Solivan en el año 2000 (285 min). Sin embargo, resultan muy diferentes a los obtenidos por Conzelman *et al.* (1987) (1122 min). Este hecho puede ser debido a distintos factores, como son la diferencia de edad de los animales, el peso, el sexo, el tipo de producción, la tensión de las aves o la dosis de fármaco administrada. Todos ellos son factores que pueden influir sobre la eliminación del fármaco. En el caso de la administración intramuscular Bugyei *et al.* (1999) señalan una semivida de eliminación del enrofloxacino de 636 min tras una dosis de 5 mg/kg.

En cuanto al aclaramiento, no se observan diferencias significativas tras la administración oral, intramuscular y intravenosa. Así, tenemos un Cl de 3 ml/min·kg para la vía oral y de 4,16 ml/min·kg para el resto de vías (Bugyei *et al.*, 1999). Dichos resultados se corresponden con los obtenidos por Anadón *et al.* (1992) (4,8 ml/min·kg).

La semivida de eliminación del enrofloxacino observada tras la administración intravenosa en **peces** fue de 1800 a 1400 min (Browser *et al.*, 1992; Lewbart *et al.*, 1997). Los estudios llevados a cabo en **camellos** revelan una  $t_{1/2\beta}$  de 214,8 min (Gavrielli *et al.*, 1995), mientras que en **ratas** y **ratones** oscila entre 88,8 y 108 min tras la administración del fármaco por vía intravenosa (Bregante *et al.*, 1999).

En el caso particular de los **animales exóticos**, la semivida de eliminación del enrofloxacino obtenida para el varano de la sabana tras la administración de 10 mg/kg por vía oral fue de 1440 min, siendo de 2160 min tras la administración de la misma dosis por vía intramuscular (Hungerford *et al.*, 1997). Los estudios llevados a cabo en pitones birmanas y tortugas estrella indias reflejan semividas de eliminación de 382,2 y 306 min respectivamente, tras la administración de 5 mg/kg por vía intramuscular (Young *et al.*, 1997; Raphael *et al.*, 1994). Para el caimán americano se han obtenido valores de  $t_{1/2\beta}$  igual a 1260 min para la vía intravenosa y de 4663,8

min para la vía oral. El Cl obtenido tras la administración intravenosa de 5 mg/kg fue de 0,78 ml/min·kg (Helmick *et al.*, 2004).

## 10. LA GLÁNDULA MAMARIA

### 10.1. ORIGEN Y DESARROLLO DE LA GLÁNDULA MAMARIA

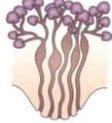
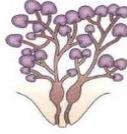
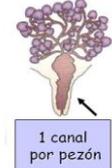
La glándula mamaria es una glándula epitelial exocrina, que sintetiza leche en células especializadas llamadas lactocitos, agrupados en alvéolos, y que es excretada por medio de un sistema de conductos de estructura ramificada (Turner, 1952; Schmidt, 1974). Es exclusiva de los mamíferos (*Mammalia*) y está, cuantitativa y cualitativamente, adaptada a las necesidades de crecimiento y a la conducta de cada especie.

La glándula mamaria está presente en todas las hembras de los mamíferos y, en forma rudimentaria, en todos los machos. En cuanto a su disposición, número y emplazamiento, la glándula mamaria varía según las especies animales, tal y como muestra la tabla 6 (Schmidt, 1974; Larson, 1985). Podemos observar que en rumiantes solo se desarrollan las glándulas mamarias inguinales.

De acuerdo con el número normal de glándulas mamarias, las especies domésticas pueden ser clasificadas en:

- Especies bimásticas: bajo este término se engloban aquellas hembras que sólo poseen un par de mamas o glándulas mamarias, como es el caso de la yegua, la oveja o la cabra.
- Especies tetramásticas: son aquellas hembras que como la vaca, poseen dos pares de mamas o glándulas mamarias.
- Especies polimásticas: en este caso el número de mamas o glándulas mamarias excede los dos pares. Podemos incluir en este grupo a la gata, la perra, la coneja y también a la cerda.

**Tabla 6.** Variación en cantidad, emplazamiento y número de orificios por pezón en la glándula mamaria de algunas especies animales comunes (Larson, 1985).

Orden	Nombre común	Nº de glándulas torácicas	Nº de glándulas abdominales	Nº de glándulas inguinales	Orificios por pezón
Marsupialia	Canguro rojo		4		15
Carnívora	Gato doméstico	4	2	2	
	Perro doméstico	4	4	2	
Rodentia	Ratón doméstico	4	2	4	1
Lagomorfa	Conejo	4	4	2	8 a 10
Proboscidea	Elefante	2			10 a 11
Perisodactila	Caballo			2	
Artiodáctila	Bovino			4	
	Ovino			2	
	Caprino			2	
Artiodáctila	Porcino	4	6	4	
Primate	Humano	2			15 a 25

El desarrollo de la glándula mamaria tiene lugar principalmente durante la gestación y el inicio de la lactación, involucionando rápidamente después del secado. Ésta formada, como veremos más adelante, por dos estructuras principales: el parénquima glandular y el estroma o tejido conjuntivo intersticial. Ambas estructuras se desarrollan muy temprano en el embrión. A partir del ectodermo ventral, se induce la migración de células epiteliales hacia ambos lados de la línea media, formando dos cordones mamaros en la superficie de la piel, constituidos por células epiteliales ectodérmicas, que se van estrechando hasta formar dos líneas, llamadas líneas de la leche (Pérez-Pérez y Pérez-Gutiérrez, 1987). Así, a mitad de gestación, en todos los embriones de mamíferos aparecen un total de ocho pares de esbozos mamaros. En el

caso particular del ovino, dichos esbozos pueden observarse claramente en embriones de 2 cm de largo (cerca de 30 días de edad), tal como indicó Turner (1952). A medida que avanza la gestación, algunos de estos esbozos mamarios se desarrollan para formar una glándula mamaria propiamente dicha, mientras que otros inician un proceso de involución. En el ovino, sólo se mantiene el 7° par mamario, localizado en posición inguinal (Delouis y Richard, 1991). Ocasionalmente, el 6° par puede mantenerse, dando como resultado a los denominados pezones supernumerarios.

En el momento del nacimiento, la ubre muestra ya una clara diferenciación de las cisternas (*Sinus lactiferus*) y de los pezones (*Papilla mammae*), así como también un desarrollo muy incipiente del sistema ductal. En los primeros meses de vida, la ubre muestra un crecimiento paralelo al del cuerpo del animal (crecimiento isométrico), lo que conlleva un aumento en el depósito de grasa y de tejido conjuntivo. Posteriormente la velocidad de crecimiento disminuye, para volver a aumentar en el momento de la pubertad. Es importante señalar que durante esta fase, un crecimiento excesivo del estroma en relación al parénquima glandular puede afectar negativamente la futura capacidad de producción de leche de la ubre. Así lo refieren autores como Serjrsen *et al.* en 1982; Capuco *et al.* en 1995 y Mäntysaari en 2001. Esta fase crítica ocurre antes en ovino que en vacuno, donde el crecimiento del parénquima termina antes, alrededor de los 4-5 meses de edad, y como consecuencia, la mamogénesis en las corderas se verá afectada por la nutrición durante y después de la fase positiva del crecimiento alométrico (Bocquier y Guillouet, 1990; Caja *et al.*, 2000; Tolman y Mckusick, 2001; Ayadi *et al.*, 2002).

La pubertad, es en la mayoría de las especies, el periodo de crecimiento más rápido para los ductos y el estroma de la glándula mamaria. El comienzo de la actividad cíclica del ovario da lugar a la producción de estrógenos (fase folicular) y progesterona (fase luteal) que inducen el desarrollo preferencial del tejido mamario y provocan una aceleración del crecimiento de la glándula mamaria. En dicho crecimiento, también es necesaria la presencia de la prolactina, hormona de crecimiento y corticoides adrenales.

Durante la gestación, los conductos continúan alargándose y ramificándose. Hacia la mitad de la gestación los alveolos están ya formados, pero las células secretoras no proliferan y no se diferencian hasta el último tercio (Knight y Wilde, 1993), momento en el cual aparece la cavidad alveolar. La prolactina es la responsable del desarrollo de las células epiteliales secretoras en el interior del alveolo, y la hormona de crecimiento favorece el crecimiento de los conductos. Acompañando a la acción de las hormonas anteriormente mencionadas se encuentra también el lactógeno placentario.

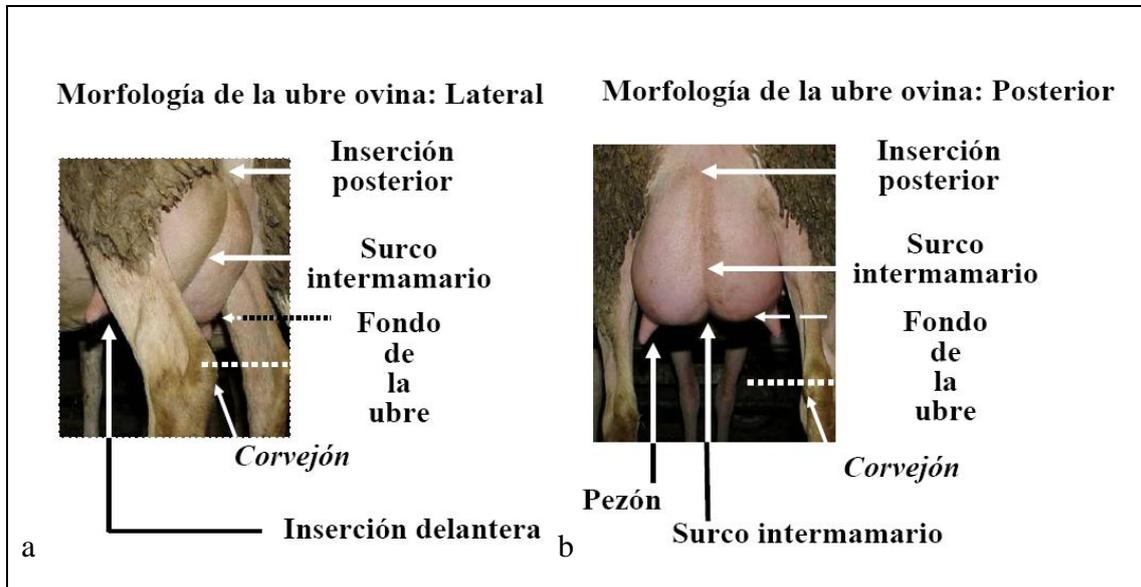
Durante el proceso de secado, ocurre el proceso inverso. Se observa la desaparición de los alveolos y sustitución de los mismos por tejido adiposo, la luz alveolar es prácticamente inexistente, y los lactocitos se agrupan en bloques compactos poco diferenciados, aumentando la proporción de estroma. Sin embargo, el proceso más importante es la regresión del tejido secretor, con la consiguiente alteración en la secreción láctea, que sucede como consecuencia del cambio estructural que tiene lugar en el lactocito y su muerte celular (apoptosis) (Climent *et al.*, 2005).

## **10.2. ANATOMÍA EXTERNA**

El complejo mamario o ubre, en el ganado ovino se sitúa en la región inguinal, posee generalmente forma globular (aplanada en el lado septal), y está constituido por un par de glándulas mamarias separadas por un surco intermamario, medial y superficial. Este surco marca generalmente la división de la ubre en dos mitades; derecha e izquierda (figura 16). Cada una de las glándulas está localizada medial y caudalmente al seno inguinal del mismo lado, y está provista de un pezón. De forma general, los pezones son cilíndricos con una longitud de 2 a 3 cm, situándose lateralmente y con sus extremos dirigidos craneal o ventrolateralmente. En el ganado ovino el número de orificios por pezón se reduce a uno.

La piel de revestimiento de la ubre es fina, flexible y móvil sobre la fascia subyacente, excepto en los pezones, donde está unida a las capas más profundas que

forman su pared. Sobre la parte caudal de la ubre, pueden observarse pliegues cutáneos que ascienden hacia la región del periné.



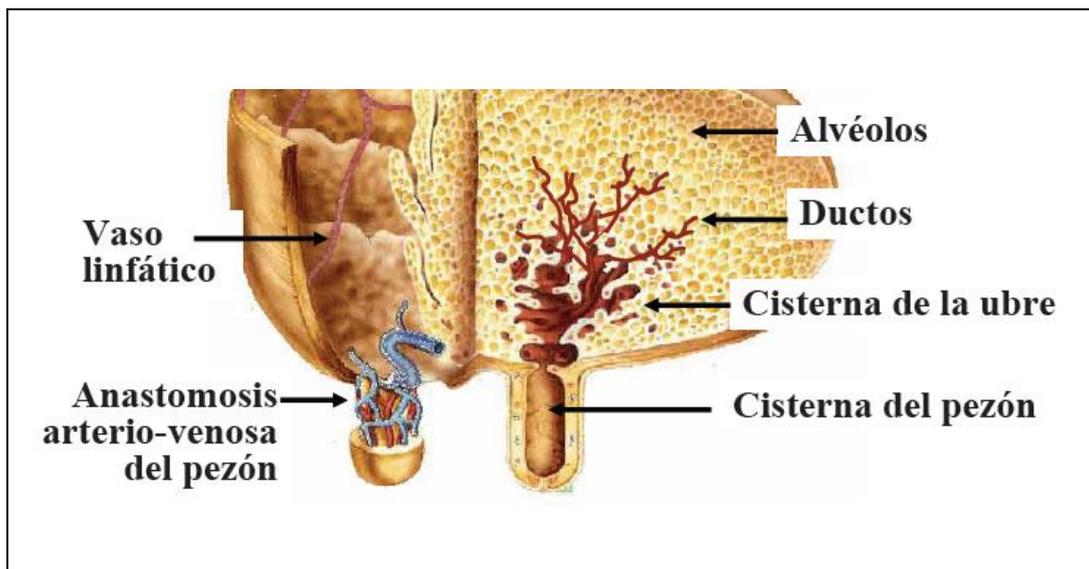
**Figura 16.** Morfología externa de la ubre ovina: a) Vista lateral. b) Vista posterior.

La parte superior de la ubre de la oveja puede estar cubierta por lana fina y sedosa, pero la parte que no lo está tiene generalmente una pigmentación clara y frecuentemente puede estar manchada por la secreción de las glándulas sebáceas existentes en el interior de las bolsas cutáneas inguinales, que están situadas entre la ubre y la cara interna del muslo. La secreción de estas glándulas se caracteriza por ser de color amarillo y de consistencia grasienta. Estas invaginaciones cutáneas, denominadas también senos inguinales, y su secreción sebácea, poseen dos propiedades fundamentales: una es la presencia de feromonas que promueven el reconocimiento materno-filial, y la otra es la disminución del roce propio del movimiento de la ubre en lactación (Ruberte *et al.*, 1994a y b). A diferencia de los bóvidos, los pezones del ganado ovino están cubiertos por pelos finos diseminados.

### 10.3. ANATOMÍA INTERNA

La glándula mamaria es una glándula compuesta, de tipo tubuloalveolar, y como se ha mencionado anteriormente se trata de una glándula sudorípara modificada, y exocrina. Sin embargo, algunos componentes de la leche, como las proteínas y los carbohidratos, son excretados en forma merocrina, y otros, como los lípidos, de forma apocrina (Banks, 1986).

El cuerpo de la mama de la oveja es comparable al de otras especies domésticas, estando constituido por una cápsula fibroelástica, tejido conjuntivo intersticial (estroma) y tejido glandular (figura 17). El parénquima glandular y el tejido conjuntivo se distribuyen en función de la actividad secretora de la glándula. Así, conviene señalar que el tejido intersticial aumenta con la edad.



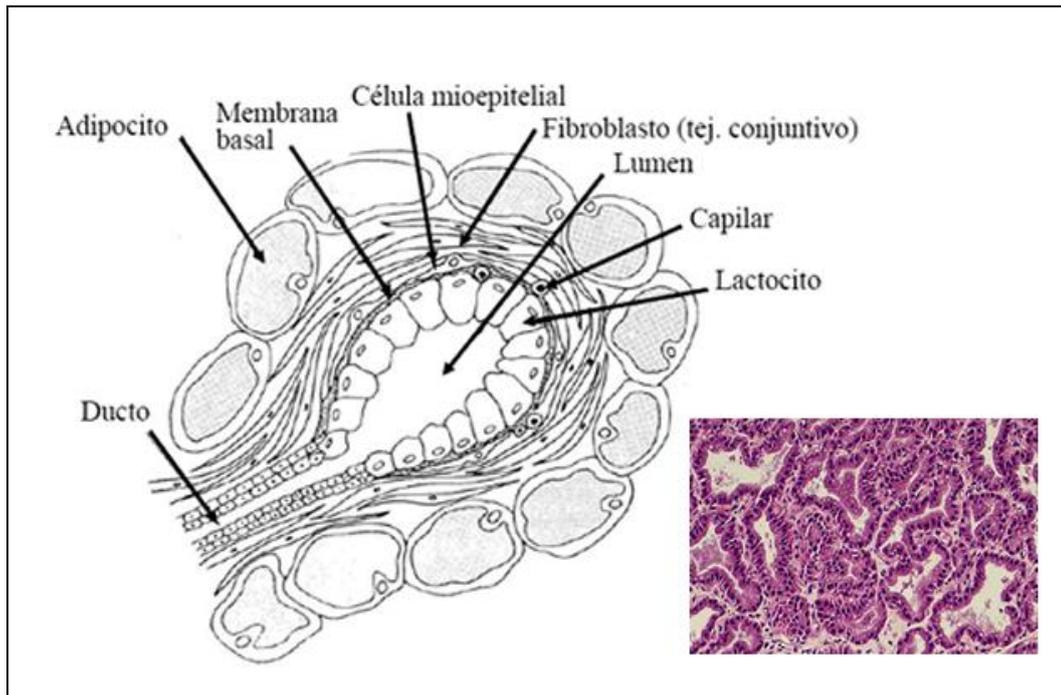
**Figura 17.** Estructura interna de la ubre (Hospes y Seeh, 1999).

Además de su envoltura cutánea, la ubre posee un sistema de fascias que funcionan como un sistema de sostén, llamado aparato suspensor mamario (*Aparatus suspensorius mamarius*). Éste está formado por hojas o láminas laterales (*Laminae laterales*) de tejido conjuntivo denso y fibroso, responsables de la fijación de la

mama al tronco y al perineo. Además, estas láminas laterales protegen los vasos mamarios que circulan por el canal inguinal. Dentro del aparato suspensor nos encontramos también con unas láminas mediales (*Laminae mediales*) de tejido elástico, que se originan en la zona ventral del coxal y en los músculos de la pared abdominal, dirigiéndose hacia el centro de la ubre y emitiendo láminas que se unen a los ligamentos o láminas laterales. De esta forma las láminas mediales separan los dos complejos mamarios por medio de un septo, el cual determina externamente el surco intermamario. Así, las dos mamas quedan funcionalmente separadas entre sí, derecha e izquierda, por la envoltura de tejido conjuntivo que las circunda (Ruberte *et al.*, 1994a y b; Such y Ayadi, 2002).

El parénquima glandular es la parte secretora de la glándula, está constituido por una red de conductos, que van desde las estructuras más internas que son los alveolos, hasta las más externas responsables de la recogida y transporte de la leche, como son las porciones glandular (cisterna) y papilar (pezón) del seno lactífero.

Los alveolos representan las unidades secretoras de la glándula (figura 18). La pared de dichos alveolos está revestida por un epitelio simple secretor, de células cúbicas llamadas lactocitos, que se asientan sobre una membrana basal. Los alveolos mamarios están rodeados así mismo, por un sistema capilar arteriovenoso y por células mioepiteliales que, bajo el efecto vasoconstrictor de la hormona oxitocina, expulsan la leche acumulada en los alveolos hacia la cisterna mamaria. Esta última puede almacenar la leche secretada entre ordeños debido a la elasticidad de sus paredes, que pueden variar entre las distintas razas lecheras. El tamaño de los alveolos varía según los estadios de la actividad secretora, poseyendo así límites irregulares tras el ordeño, cuando se halla la luz parcialmente colapsada.

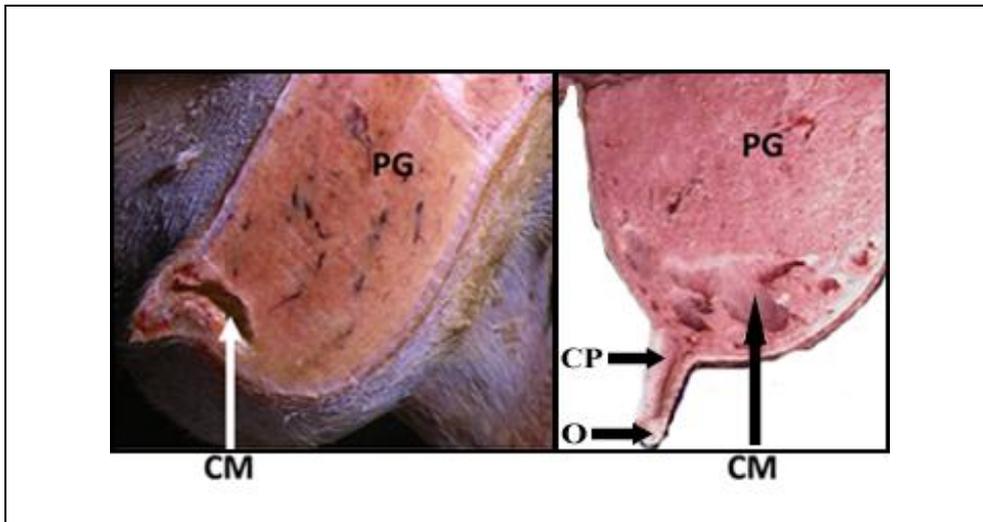


**Figura 18.** Estructura del alvéolo mamario.

Los alveolos se agrupan formando los lobulillos mamarios (*Lobuli glandulae mammae*). La agrupación de estos lobulillos, separados entre sí por tejido conjuntivo, forman los lóbulos (*Lobi glandular mammae*). El número de lóbulos por glándula mamaria es elevado. Los alveolos que forman el lobulillo se vacían, mediante pequeños ductos, en unos túbulos llamados ductos intralobulillares, que a su vez desembocan en un espacio colector central, del cual parten los ductos interlobulillares o galactóforos (de epitelio plano poliestratificado no queratinizado), que vierten la leche a los conductos lactíferos (Calhoun y Stinson , 1980; Gallego *et al*, 1983; Paniagua *et al.*, 2002; Ruberte *et al.*, 1994a y b).

Los conductos lactíferos (*Ductos lactiferi*) se caracterizan por ser tubos de diverso diámetro y longitud, compuestos de un epitelio de una o dos capas de células, rodeados por otra capa de naturaleza conjuntivo-elástica y por fibras musculares. Estos tubos, dispuestos de forma paralela, atraviesan regularmente el parénquima, y son los responsables de conducir la leche proveniente de los alveolos hasta el seno lactífero (Schwarze y Schröder, 1984).

En cuanto al seno lactífero (*Sinus lactiferus*), este se divide en dos partes, separadas entre sí por una constricción circular o esfínter llamado pliegue anular o cricoideo, una localizada en el interior del parénquima glandular (porción glandular), también llamada cisterna mamaria o de la ubre, y otra localizada en el interior del pezón, conocida como cisterna del pezón (porción papilar), que se comunican con el exterior por un único orificio papilar. La forma de la cisterna de la ubre es muy variada, presentando formas cavernosas que varían desde cisternas circulares a lobulares formadas a partir del ensanchamiento de los conductos lactíferos. Estos aspectos han sido confirmados en ovino, tanto de carne como de leche, mediante ecografía (figura 19) (Ruberte *et al.*, 1994a; Caja *et al.*, 2000).



**Figura 19.** Estructura interna de la ubre ovina. PG: parénquima glandular; CM: cisterna mamaria; O: orificio del pezón; CP: esfínter cricoideo (Ruberte *et al.*, 1994a y Caja *et al.*, 2000).

#### 10.4. VASCULARIZACIÓN

La irrigación sanguínea de la ubre, en su mayor parte, llega a través de la arteria pudenda externa (una por cada mitad de la ubre), que es una rama del tronco pudendo epigástrico. Al atravesar el canal inguinal la arteria pudenda externa se transforma en arteria mamaria, que llega hasta la base de cada mama. Las arterias mamarias describen una flexura sigmoidea, ésta permite un flujo de sangre continuo, relativamente lento y adaptable a las variaciones de altura que sufre la mama en producción, constituyendo así un sistema de protección para evitar un estiramiento excesivo de los vasos sanguíneos cuando la ubre está completamente llena y descende. La parte posterior de cada glándula mamaria está irrigada por la arteria mamaria caudal, rama que emite la arteria pudenda externa una vez atravesado el canal inguinal. A continuación, la arteria mamaria principal se divide en arteria mamaria craneal (arteria epigástrica superficial caudal) y arteria mamaria media. La arteria mamaria media emite la arteria del seno lactífero, además de otras pequeñas arterias, que a diferencia de los grandes rumiantes, establecen anastomosis con las de la glándula contralateral (Dyce *et al.*, 1999, Climent *et al.*, 2005). La parte posterior de la ubre está irrigada además, por las arterias perineales izquierda y derecha. La arteria pudenda externa presenta un diámetro aproximado de 0,7 cm, y va acompañada a su paso por el canal inguinal de una vena satélite (vena pudenda externa), vasos linfáticos y nervios (figura 20).

La vena pudenda externa realiza la mayor parte del drenaje venoso de la ubre. Al igual que la arteria pudenda externa describe una curva en forma de S, antes de transportar la sangre a la vena cava posterior por medio de la vena ilíaca. Después de penetrar en la ubre, la vena se ramifica múltiples veces para formar una red de vénulas que reciben sangre de cada uno de los alveolos. La segunda vena en importancia de cada una de las dos mitades de la ubre es una continuación de la rama craneal de la vena mamaria que sale de la ubre por su borde anterior y sigue a lo largo de la superficie ventral del abdomen, formando la vena abdominal subcutánea.

Los alveolos están rodeados por capilares sanguíneos responsables del aporte de nutrientes, que son absorbidos por las células epiteliales, transformándose en

componentes de la leche, y posteriormente son liberados a la luz de los alveolos (Schmidt, 1974).

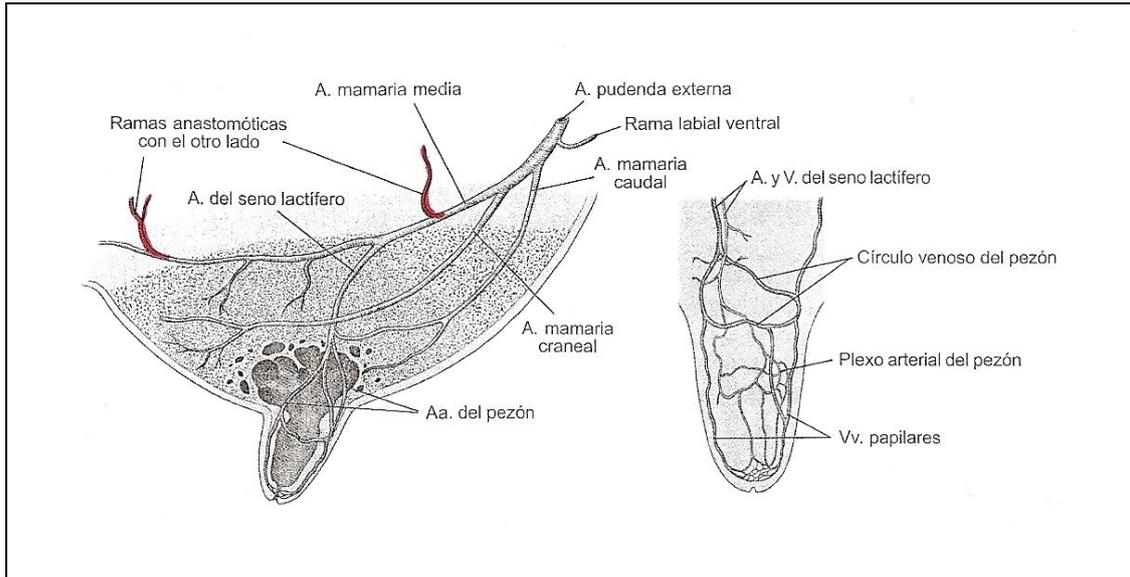
Tras el parto, el aporte sanguíneo a la ubre se incrementa considerablemente, para poder aportar la cantidad de nutrientes necesarios para la síntesis de la leche.

### **10.5. INERVACIÓN**

La ubre recibe una inervación múltiple procedente de nervios espinales lumbares y sacros. La sustancia glandular y las partes profundas de la pared del pezón están inervadas solamente por el nervio genitofemoral, el cual acompaña a la arteria y vena pudenda externa en su paso por el canal inguinal. Por su parte, la piel que reviste la ubre recibe inervación de tres procedencias distintas. Así, de craneal a caudal se ve inervada por las ramas ventrales del primero y segundo nervio lumbar, nervio iliohipogástrico y nervio ilioinguinal respectivamente, por el nervio genitofemoral y por las ramas mamarias del nervio pudendo (Climent *et al.*, 2005).

### **10.6. VASOS LINFÁTICOS**

Los linfáticos que drenan la ubre se manifiestan bajo la piel, sobre todo en los animales de gran producción. El drenaje linfático se produce en todo el órgano, incluso en los pezones, para llegar a los ganglios inguinales superficiales (mamarios o supramamarios), situados fuera del anillo inguinal externo sobre la porción caudal de la base de la ubre.



**Figura 20.** Vascularización de la glándula mamaria de la oveja  
(Climent *et al.*, 2005).

### 10.7. MODELOS *IN VITRO* DE UBRE PERFUNDIDA

Los modelos de ubre aislada perfundida han tenido hasta la fecha poco uso como modelo fisiológico. Zeitlin y Eshraghi (2002) llevaron a cabo una búsqueda bibliográfica retrospectiva desde el año 1964 hasta 2001, obteniendo menos de 40 publicaciones al respecto.

El primer grupo de investigadores en utilizar el modelo *in vitro* de ubre bovina perfundida fue el compuesto por Peeters y Massart-Leen en 1947. El medio de perfusión utilizado en estos estudios iniciales fue sangre heparinizada y oxigenada. En el caso del modelo de ubre bovina se utilizó sangre bovina y años más tarde en estudios similares que utilizaban el modelo de ubre caprina, sangre de cabra (Massart-Leen *et al.*, 1986). Este modelo de ubre caprina fue utilizado también por otros investigadores, que a diferencia de los anteriores utilizaron la solución de Krebs-Henseleit en vez de sangre como medio de perfusión (Hardwick y Linzell, 1960; Linzell *et al.*, 1972).

En estudios más recientes llevados a cabo por Kietzmann y sus colaboradores, en los distintos modelos de ubre aislada perfundida, la solución de perfusión utilizada ha sido la denominada solución Tyrode (Kietzmann *et al.*, 1993; Bäumer y Kietzmann, 2001; Zeitlin y Eshraghi, 2002). Estos modelos se utilizaron como punto de partida para el modelo *in vitro* de ubre ovina perfundida descrito en este trabajo.

El modelo de ubre perfundida ha sido utilizado para estudiar el metabolismo mamario (Wood *et al.*, 1965; Hardwick, 1966), el mecanismo de producción de leche (Hardwick y Linzell, 1960) así como la farmacología (Kietzmann *et al.*, 1993) y fisiopatología (Bäumer y Kietzmann, 2001) de la piel. Por su parte Zeitlin y Eshraghi (2002) lo utilizaron para el estudio de la liberación de mediadores locales y la modulación del flujo sanguíneo mamario. Además, este modelo *in vitro* se considera adecuado para el estudio de la farmacocinética de los fármacos administrados por vía intramamaria, así como para determinar las concentraciones de fármaco activo en el tejido mamario después de la administración sistémica e intramamaria (Ehinger y Kietzmann, 2000a y b; Ehinger *et al.*, 2006).

Actualmente, y por razones éticas y prácticas, para evaluar la distribución tisular de los antibacterianos administrados por vía intramamaria, se realiza el muestreo de leche y sangre *in vivo* (Rollins *et al.*, 1970). Sin embargo, este método no representa exactamente la concentración verdadera del fármaco en el tejido glandular. El estudio *in vitro* realizado en este trabajo permite medir las concentraciones del fármaco en el tejido mamario, y supone un complemento a los estudios de distribución llevados a cabo *in vivo*.

## 11. MASTITIS EN GANADO OVINO

Las mastitis suponen uno de los mayores problemas sanitarios y económicos que afectan al sector lechero ovino, debido a los efectos que ocasiona sobre la producción y la calidad de la leche.

El conocimiento de los microorganismos causantes de mastitis en el ganado ovino lechero es importante, no sólo para el tratamiento sino también para la aplicación de programas de control de esta enfermedad, debido a las diferencias que presentan entre sí en cuanto a hábitat, formas de transmisión, repercusión clínica y productiva.

Los trabajos realizados al respecto son numerosos, aunque en la mayor parte de las ocasiones se centran en estudios etiológicos sobre un número de rebaños limitado y en áreas geográficas concretas. Sin embargo, existe un estudio muy completo realizado por Esnal *et al.*, en 2008, en el cual se estudió un número muy elevado de muestras (17.978) y de rebaños (2.000), pertenecientes a toda la geografía española (Castilla y León 72%; Castilla la Mancha 18,62%; Otras 9,38%).

Por otro lado, estudiar la distribución de cada patógeno en función de su presentación clínica o subclínica, puede reflejar una etiología predominante distinta en función de dicha presentación, ayudando a reorientar posibles estrategias de control.

Los principales estudios etiológicos sobre mastitis en ganado ovino lechero realizados en España, muestran que el grupo patógeno más aislado en términos globales son las Micrococcaceas, representado por *Staphylococcus spp.* (*Staphylococcus aureus*) y *Micrococcus spp.* (SCN + *Micrococcus spp.*). Las bacterias del género *Staphylococcus spp.* son responsables del 60-80% de los casos de mastitis en pequeños rumiantes (Las Heras *et al.*, 1999). El segundo grupo más aislado es el representado por *Mycoplasma spp.*, siendo el tercero el de las Streptococcaceas, que incluye a *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* y *Enterococcus spp.* (Marco, 1994; González-Rodríguez *et al.*, 1995; Gonzalo *et al.*, 2002; Esnal *et al.*, 2008).

La frecuencia de aislamiento de los patógenos en función del tipo de mastitis muestra diferencias notables. Así, en el estudio llevado a cabo por Esnal *et al.*, (2008), en las mastitis clínicas el patógeno más frecuente aislado fue *Mycoplasma* spp. seguido de *Staphylococcus aureus*. Por el contrario, el grupo de los SCN, si bien manifestó una patogenicidad clínica elevada, su frecuencia a nivel clínico fue marcadamente inferior que a nivel subclínico. Destaca en el caso de las mastitis clínicas la presencia de especies minoritarias como *Pseudomonas* spp, *Mannheimia* spp., *Pasteurella* spp. y *Arcanobacterium pyogenes*. El importante papel que juega *Staphylococcus aureus* en las mastitis clínicas del ganado ovino y la menor patogenicidad a nivel clínico de los SCN está además ampliamente documentado (Marco, 1994; Bergonier *et al.*, 2003a y b). En el caso de las mastitis subclínicas fueron los SCN los patógenos más frecuentes, seguidos de *Saphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. y *Mycoplasma* spp.

Para concluir, y teniendo en cuenta los estudios anteriormente mencionados, podemos resumir diciendo que es la Agalaxia Contagiosa la patología mamaria más importante de la cabaña de ovino lechero de nuestro país.

Por otro lado, una vez que una mastitis clínica aguda es detectada, no hay más remedio que adoptar medidas terapéuticas, ya que de lo contrario podemos comprometer la funcionalidad de la glándula afectada o incluso la vida del animal. Aunque algunos ensayos han utilizado con éxito la administración supramamaria, lo cierto es que en la práctica el tratamiento de las mastitis clínicas agudas se realiza por vía intramamaria y/o por vía intramuscular. En general la vía intramamaria es el mejor método para asegurar la presencia de altas concentraciones de antibacteriano en la glándula mamaria. Sin embargo, en algunos casos la intensidad de la respuesta inflamatoria puede dificultar el acceso de los antibacterianos vía canalicular, siendo necesario entonces recurrir también (o como método único) a la administración parenteral.

La administración intramamaria de antibacteriano debe realizarse una vez al día, después de un vaciado a fondo de la ubre. Pero si el proceso inflamatorio nos obligara a realizar un nuevo vaciamiento de la ubre afectada antes de 24 horas, repetiremos la administración del antibacteriano. Si se va a complementar el

tratamiento intramamario con un antibacteriano vía parenteral, debemos asegurarnos que el antibacteriano elegido no sea antagonista del usado vía intramamaria y que la farmacocinética del mismo asegure su presencia en la glándula mamaria.



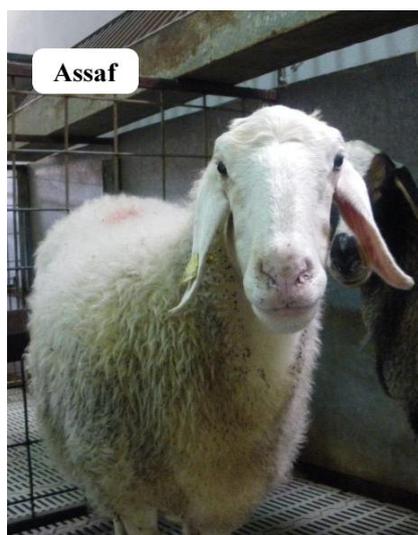
# ***MATERIAL Y MÉTODOS***



## 1. MODELO *IN VITRO* DE UBRE OVINA PERFUNDIDADA

Para el desarrollo del modelo de ubre ovina perfundida nos hemos basado en los estudios previamente realizados por diversos autores que habían utilizado ubre bovina (Linzell *et al.*, 1972; Kietzmann *et al.*, 1993; Ehinger y Kietzmann, 2000a y b; Pittermann, 1999; Zeitlin y Eshraghi, 2002; Ehinger *et al.*, 2006; Kietzmann *et al.*, 2008).

Para este estudio se emplearon 32 ovejas sanas de raza Assaf, procedentes de la granja asociada a la Facultad Veterinaria de la Universidad de León. La edad de dichos animales estuvo comprendida entre los cuatro y cinco años, siendo el peso medio de  $50 \pm 6,7$  kg por animal (figura 21).



**Figura 21.** Oveja Assaf.

Los animales se encontraban en distintas fases de lactación, recibiendo dos ordeños diarios y una alimentación especial basada en la administración de cebada a libre disposición, heno de hierba y una mezcla unifeed (a razón de 3 kg por animal y día). Esta mezcla unifeed está compuesta por maíz, soja, pulpa de remolacha, algodón, alfalfa, cebada y un corrector vitamínico-mineral.

En el momento de su utilización, los animales fueron trasladados a la Unidad de Cirugía de la Facultad Veterinaria, donde previo ordeño, se procedió a su eutanasia y posterior disección de la glándula mamaria para desarrollar el modelo de ubre ovina perfundida.

El protocolo utilizado para la eutanasia consistió en la administración secuencial de 3 fármacos por vía intravenosa en la vena yugular. El primero de ellos fue el propofol (PropoVet<sup>®</sup>) a una dosis de 3 mg/kg de peso vivo. Inmediatamente después se administró heparina (Heparina Rovi 5%<sup>®</sup>) a una dosis de 20.000 UI/oveja, lo que equivale a 400 UI/kg de peso vivo, con el fin de evitar la coagulación sanguínea post mortem y facilitar la sustitución de sangre por la solución de perfusión en todo el entramado vascular. Aunque estudios anteriores muestran la utilización de una dosis de heparina superior, 1000 UI/kg de peso vivo (Linzell *et al.*, 1972), hemos podido comprobar durante las pruebas preliminares, que no es necesaria una dosis tan elevada. Por último, transcurridos unos 5 min de la administración del anticoagulante, se procedió a la administración del eutanásico, en este caso Embutramida (T-61<sup>®</sup>) a una dosis de 100 mg/kg de peso vivo (figura 22).



**Figura 22.** Fármacos utilizados en el protocolo de eutanasia.

Inmediatamente después de la eutanasia se realizó la disección de la glándula mamaria. Para ello se colocó al animal en decúbito supino, fijando las extremidades posteriores para facilitar el acceso a la zona abdominal. Posteriormente se procedió al rasurado y limpieza, tanto de la ubre como de la zona adyacente a la misma. A continuación se realizó una incisión cutánea oval alrededor de la ubre, tomando como punto de referencia el ombligo del animal. Se ligaron las venas abdominales mamarias subcutáneas, así como otros pequeños vasos observados, a medida que se realizaba disección roma con la mano o con una tijera de disección de punta roma, para separar la glándula mamaria de la pared abdominal. Las arterias y venas mamarias fueron ligadas en su salida del canal inguinal (figura 23).

Destacar que en la disección de la ubre se incluyó no solo la glándula mamaria, sino también el aparato suspensor medio y la piel adyacente, dos estructuras importantes para la posterior sujeción de la ubre en el soporte metálico (figura 24).

Una vez finalizada la disección y ligadas las arterias y venas correspondientes, se procedió a suspender la ubre en un soporte tubular metálico, de forma que, los pezones quedasen libres y la ubre en una posición lo más fisiológica posible. Para ello la ubre fue suspendida por la piel y el ligamento suspensor medio, tal y como se muestra en la figura 24.

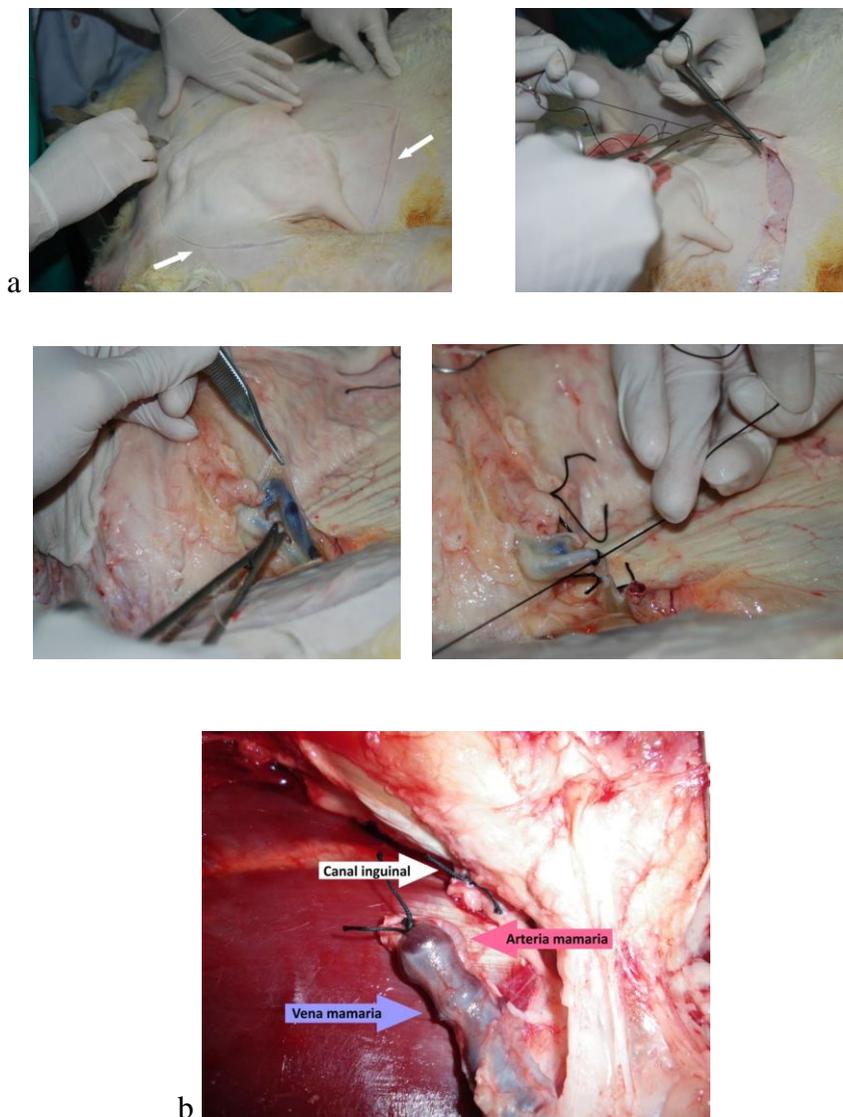
Se canula entonces la arteria y vena mamaria de una de las glándulas, ya que en este estudio sólo se perfunde la mitad del órgano, permaneciendo, por lo tanto, ligada la arteria y vena mamaria de la glándula contralateral. Para la canulación tanto de la arteria como de la vena mamaria se empleó un Catéter intravenoso de 14 GA (2,1 x 45 mm) (BD Insyte™), que fue fijado al vaso mediante la utilización de sutura.

Seguidamente, la arteria mamaria fue perfundida con 50 ml de medio de perfusión, que en nuestro caso fue solución Tyrode. Esta solución estaba compuesta por: 8 g/l de NaCl; 200 mg/l de KCl; 265 mg/l de CaCl<sub>2</sub> 2 H<sub>2</sub>O; 213 mg/l de MgCl<sub>2</sub> 6 H<sub>2</sub>O; 1 g/l de NaHCO<sub>3</sub>; 65 mg/l de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,1 mg/l de glucosa, y tenía un pH de 7,4. La solución se heparinizaba con 1.000UI/l de heparina, se burbujeaba con una

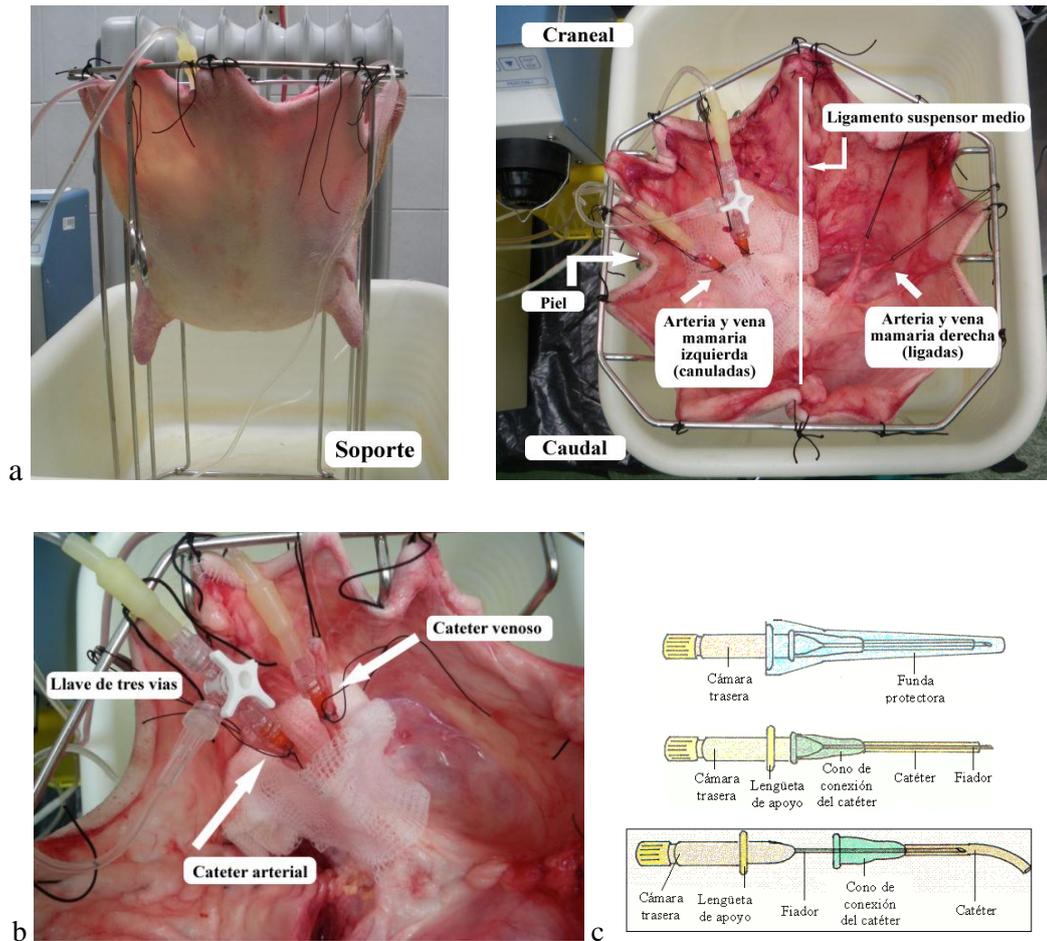
## Material y métodos

mezcla de gases (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>) y se mantenía a una temperatura de 39,86 ± 0,21°C. En nuestro estudio, además se le añadió el diurético osmótico, manitol (60 g/l), para reducir la formación de edema observada por otros autores en estudios similares (Kietzmann *et al.*, 1993; Zeitlin y Eshraghi, 2002).

Esta perfusión inicial de 50 ml de solución Tyrode permite limpiar parcialmente el sistema circulatorio, permitiendo así sustituir poco a poco la sangre por la solución Tyrode.



**Figura 23.** a) Disección de la glándula mamaria. b) Arteria y vena mamaria en su salida del canal inguinal.



**Figura 24.** a) Fijación de la ubre al soporte metálico. b) Canulación de la arteria y vena mamaria. c) Catéter intravenoso.

Inmediatamente después, y ya de forma continua, se hace pasar el líquido de perfusión a través de la glándula mamaria, ayudándonos para ello de una bomba peristáltica (Percom-I). El flujo de perfusión depende de la presión alcanzada a nivel de la glándula mamaria. La presión de perfusión es medida de forma continua durante todo el procedimiento mediante un transductor conectado a una T o llave de tres vías, al cateter arterial, y al monitor de presiones (hp Hewlett Packard Model 66S).

Durante el estudio inicial se valoró la relación entre el flujo de perfusión y la presión alcanzada, ajustándose la presión de perfusión en un rango de 50-60 mmHg (Kietzmann *et al.*, 2008). Aunque la presión alcanzada en el modelo *in vitro* resulta

inferior a la presión alcanzada *in vivo*, se ha demostrado que el flujo de perfusión es suficiente para que el líquido llegue a todos los vasos sanguíneos, incluso a los vasos subcutáneos. Para demostrar este hecho, se procedió a realizar la prueba del Trypan azul al 1%. Así, al final del periodo de perfusión se administró una solución de Trypan azul al 1% por vía intravenosa (arteria mamaria), realizando posteriormente la necropsia de la ubre y observándose la tinción azulada, tanto de los vasos subcutáneos, como del tejido glandular y conectivo de la glándula perfundida. Se debe tener en cuenta la presencia de una tinción azulada ramificada muy leve a nivel de la glándula no perfundida. Este hecho es debido a que en la especie ovina, y a diferencia de la bovina, la arteria mamaria media emite no sólo la arteria del seno lactífero sino también una serie de pequeñas arteriolas que establecen anastomosis con las arteriolas de la glándula contralateral (Dyce *et al.*, 1999; Climent *et al.*, 2005). En todos los órganos incluidos en este estudio el resultado de esta prueba fue positivo (figura 26 y 27).

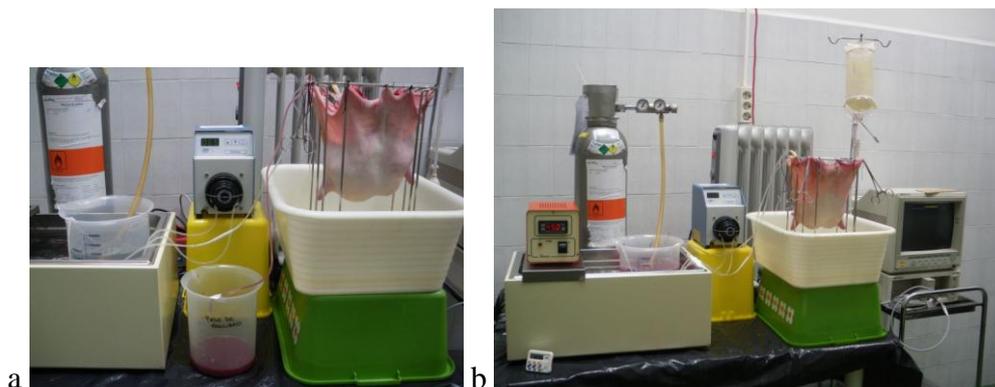
Durante el tiempo que duró el experimento la ubre fue mantenida a una temperatura de  $37 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ . Para ello se utilizó un radiador eléctrico colocado cerca de la ubre. Para evitar la excesiva desecación de los tejidos expuestos se procedió a irrigar de forma periódica dichos tejidos con solución Tyrode.

El líquido de perfusión, se mantuvo, como ya se mencionó anteriormente, a una temperatura de  $39,86 \pm 0,21^{\circ}\text{C}$ , mediante la ayuda de un baño térmico (Bunsen TFB) a  $45^{\circ}\text{C}$ . Para controlar la temperatura del líquido a lo largo del periodo de perfusión, se llevaron a cabo mediciones periódicas de la misma a nivel del catéter de salida. La media de los valores obtenidos fue de  $34,82 \pm 0,19^{\circ}\text{C}$ . Debemos señalar que la temperatura de entrada fue medida a nivel del recipiente que contenía los 4 litros de solución de perfusión, mientras que la temperatura de salida fue medida a nivel del tubo de plástico conectado al catéter venoso. Este dato es importante ya que la pérdida de temperatura del líquido de perfusión en su recorrido por el tubo, tanto de entrada como de salida, es de  $1^{\circ}\text{C}$ . De ello se deduce, que en el momento de entrada del líquido en la glándula mamaria, la temperatura del mismo fue de  $38,86 \pm 0,21^{\circ}\text{C}$ , mientras que la temperatura de salida fue de  $35,82 \pm 0,19^{\circ}\text{C}$ .

Una vez iniciada la perfusión continua de la glándula, existe una fase denominada fase de equilibrio.

En los experimentos llevados a cabo con tejidos aislados perfundidos se debe tener en cuenta el siguiente aspecto: la sustitución de sangre como líquido de perfusión en el animal vivo por la solución de perfusión, en este caso solución Tyrode, en el modelo *in vitro* lleva consigo la aparición de una serie de cambios en los distintos parámetros bioquímicos. Para conseguir de nuevo el equilibrio, y la estabilización en dichos parámetros, se requiere de un periodo más o menos largo. Al respecto, Kietzmann *et al.* (1993) establecieron en sus estudios un periodo de equilibrio de 15 min, sin embargo Hardwick y Linzell (1960) y Peeters y Massart-Leen (1947) que llevaron a cabo estudios en ubres caprinas y bovinas perfundidas respectivamente, no mencionan la utilización previa de un periodo de equilibrio. Por otro lado, Zeitlin y Eshraghi (2002), establecieron un periodo de equilibrio de 30 min.

En nuestro caso, y estando de acuerdo con la necesidad de un primer momento de equilibrio tras la sustitución de sangre por el líquido de perfusión, se consideró oportuno establecer dicho periodo en 20 min. Además de producirse el remplazo completo de sangre de todos los vasos sanguíneos por el líquido de perfusión, se ajusta tanto el flujo como la presión de perfusión. Durante esta fase, estamos ante un circuito abierto, es decir, el líquido que entra por el catéter arterial y sale por el catéter venoso, no vuelve al recipiente inicial, sino a un recipiente colector. Una vez transcurridos los 20 min, y observado que el líquido que sale por la vena ha virado de rojo a casi incoloro se procede a establecer un circuito cerrado. En este circuito el líquido que sale por el catéter venoso vuelve al recipiente inicial. El volumen que tenemos en el recipiente inicial es de 4 litros, que corresponde al volumen total de sangre de una oveja de unos 50 kg de peso vivo. Este volumen ha sido calculado teniendo en cuenta que el volumen sanguíneo de una oveja es de 80-90 ml/kg de peso vivo y que el peso medio de nuestros animales fue de  $50 \pm 6,7$  kg (figura 25).



**Figura 25.** a) Circuito abierto (fase de equilibrio). b) Circuito cerrado (recirculación).

El experimento finalizó a los 180 min de completada la fase de equilibrio e instaurado el circuito cerrado. Durante este periodo se tomaron muestras del líquido de perfusión a distintos tiempos (30; 60; 90; 120; 150 y 180 min). A los 180 min se tomaron las muestras de tejido mamario (biopsias) a los 2, 4, 6 y 8 cm de altura, tomando como punto de referencia la base del pezón.

Tanto las muestras de líquido perfundido como las muestras de tejido mamario fueron congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , y posteriormente almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

El protocolo anteriormente descrito fue aplicado tanto para el grupo de administración *sistémica*, como para el de administración intramamaria de enrofloxacino.

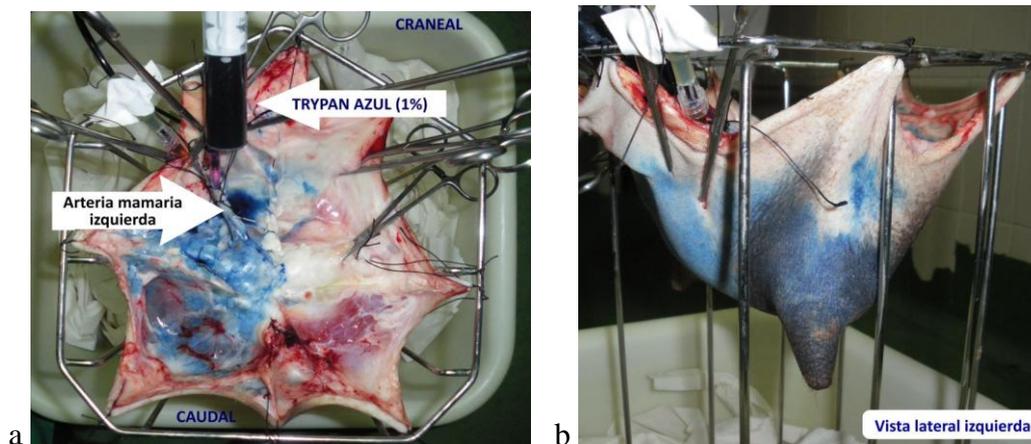
## 1.1. ESTUDIO DE VIABILIDAD

La viabilidad de las ubres perfundidas fue controlada mediante la utilización de parámetros bioquímicos, tales como, el consumo de glucosa y la producción de lactato. (Kietzmann *et al.*, 1993; Ehinger y Kietzmann 2000a y b; Ehinger y Kietzmann, 2006; Kietzmann *et al.*, 2008). Dichos parámetros fueron medidos en la

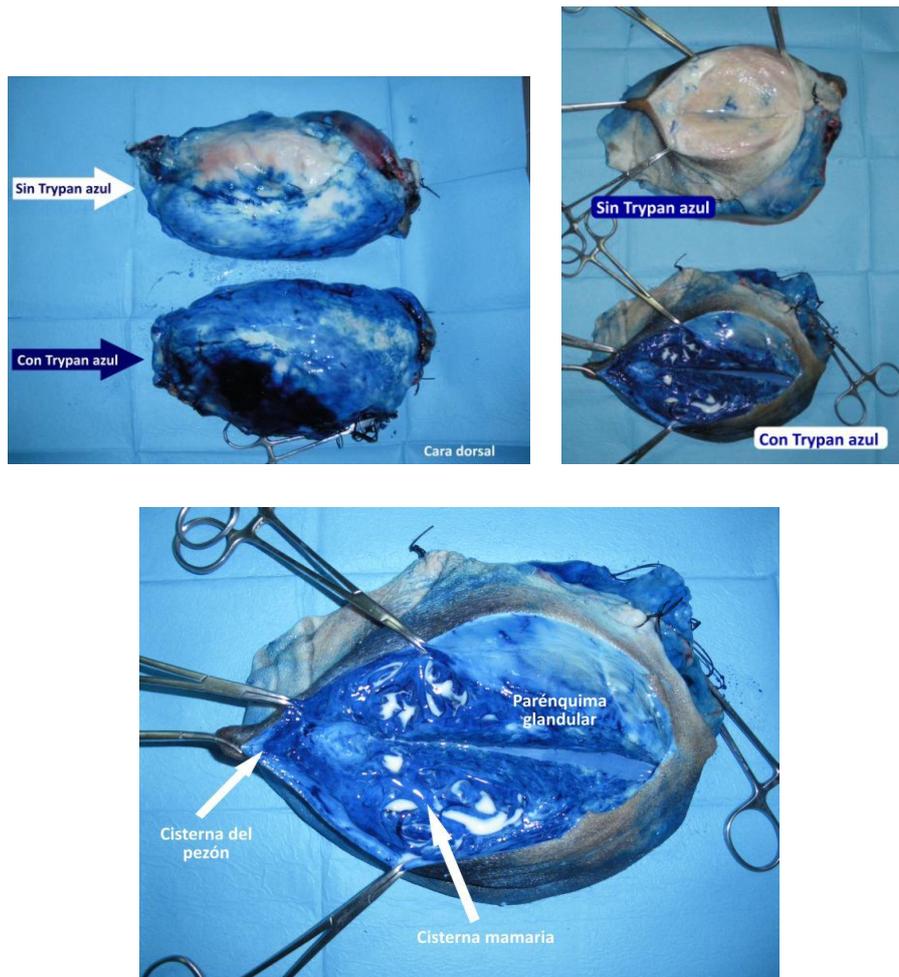
solución Tyrode a los mismos tiempos a los que obtuvimos las muestras para la determinación del fármaco.

De la misma forma se controló el pH de la solución Tyrode, así como el flujo y la presión de perfusión.

Una vez finalizado el periodo de perfusión y con el objetivo de llevar a cabo un estudio histológico para descartar la presencia de lesiones en el tejido perfundido se procedió a la recogida de muestras, tanto del tejido mamario perfundido como del tejido mamario contralateral no perfundido. Todas las muestras se introdujeron, durante 2 días, en una solución de formol tamponado al 10% para realizar su fijación. Tras su procesamiento histológico rutinario, se obtuvieron secciones de 3µm de grosor que fueron teñidas posteriormente mediante la técnica de hematoxilina-eosina (H-E).



**Figura 26.** a) Prueba Trypan azul: administración. b) Distribución del colorante por los vasos subcutáneos.



**Figura 27.** Necropsia: distribución del colorante (Trypan azul) por la glándula mamaria.

## 1.2. ADMINISTRACIÓN DEL FÁRMACO Y TOMA DE MUESTRAS

### 1.2.1. Administración intramamaria

En 14 de las ubres y tras la fase de equilibrio, se procedió a la administración de la formulación de enrofloxacin (1 g de enrofloxacin (5 g de pomada al 20% m/m)) por vía intramamaria, es decir, a través del canal del pezón, previamente desinfectado con alcohol al 96%. Una vez administrada la pomada, se practicó un ligero masaje a nivel de la cisterna, tanto del pezón como mamaria, para favorecer la distribución del fármaco (figura 28).



**Figura 28.** a) Desinfección del pezón. b) Administración intramamaria de la pomada a base de enrofloxacin.

### 1.2.2. Administración sistémica

La administración *sistémica* del fármaco en el modelo *in vitro* de ubre ovina perfundida, fue simulada en 12 ubres mediante la adición de una única dosis de enrofloxacin (17,04 mg) al líquido de perfusión, equivalente a una dosis de 5 mg/kg de peso vivo.

### 1.2.3. Toma de muestras

En cuanto a la toma de muestras, y como ya se mencionó anteriormente, el protocolo seguido tanto para la administración intramamaria como sistémica fue el siguiente:

♦ Las muestras de líquido perfundido fueron tomadas a los 30; 60; 90; 120; 150 y 180 min de finalizada la fase de equilibrio.

♦ Las muestras de tejido mamario (biopsias) fueron tomadas al finalizar los 180 min de perfusión, a los 2, 4, 6 y 8 cm de altura a partir de la base del pezón.

Tanto el líquido de perfusión como las biopsias fueron congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  y posteriormente almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento (figura 29).

En el caso particular de la administración *sistémica*, se procedió a la recogida de *pseudo-leche* mediante el ordeño de la mama perfundida. Estas muestras fueron recogidas a los 180 min y almacenadas hasta su procesamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

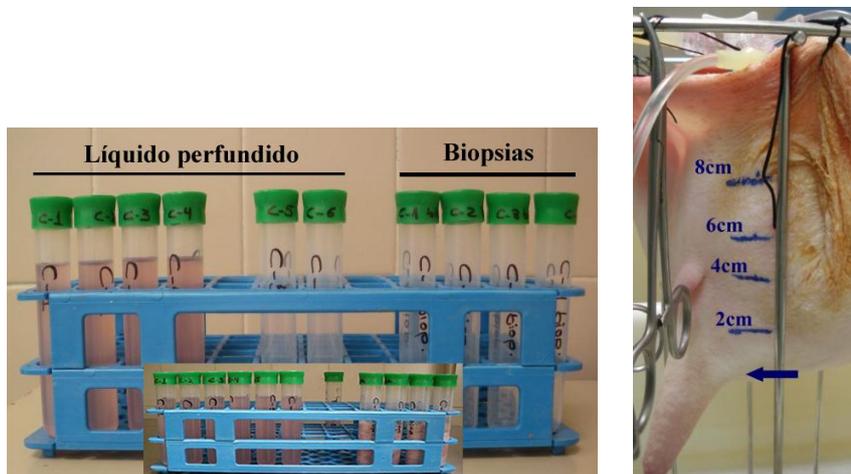


Figura 29. Toma de muestras.

## 2. MODELO *IN VIVO*: ADMINISTRACIÓN DEL FÁRMACO Y TOMA DE MUESTRAS

En este caso, se procedió a la administración de la formulación de enrofloxacino por vía intramamaria a 6 animales vivos.

Los animales fueron sometidos a un ordeño previo completo. Posteriormente, se procedió a la colocación de un Catéter intravenoso a nivel de la vena yugular, recogiendo en este momento una muestra de sangre, correspondiente al tiempo 0 (figura 30). A continuación se administró la pomada de enrofloxacino por vía intramamaria, previa desinfección del pezón. Inmediatamente después se practicó un suave masaje para favorecer la distribución del fármaco.



**Figura 30.** Canulación de la vena yugular en oveja.

Las muestras sanguíneas fueron recogidas en tubos heparinizados a los siguientes tiempos: 30; 60, 90; 120; 150 y 180 min. Transcurridos los 180 min, los animales fueron sacrificados siguiendo el protocolo descrito en el apartado 1, a excepción de la utilización de heparina. Una vez sacrificados se procedió a la toma de muestras del tejido mamario (2, 4, 6 y 8 cm).

Las muestras sanguíneas recogidas fueron posteriormente centrifugadas durante 20 min a 1.500 rpm. A continuación se extrajo el plasma sobrenadante por aspiración con pipetas Pasteur. Tanto las muestras plasmáticas como las biopsias de

tejido mamario fueron congeladas a -20°C y posteriormente almacenadas a -80°C hasta su procesamiento.

### **3. REACTIVOS, MATERIAL Y EQUIPOS EMPLEADOS EN LA PREPARACIÓN DEL MODELO *IN VITRO*, LA ADMINISTRACIÓN DEL FÁRMACO Y LA TOMA DE MUESTRAS.**

- ◆ Cloruro de sodio grado p.a. (AnalaR NORMAPUR).
- ◆ Cloruro de potasio grado p.a. (Probus).
- ◆ Cloruro de calcio grado p.a. (Panreac).
- ◆ Cloruro de magnesio grado p.a. (Probus).
- ◆ Bicarbonato de sódico grado p.a. (Probus).
- ◆ Fosfato monosódico grado p.a. (Panreac).
- ◆ Glucosa (Panreac).
- ◆ Manitol (Fresenius Kabi).
- ◆ Agua bidestilada Mili-Ro (Millipore)
- ◆ Propofol (Propovet<sup>®</sup>).
- ◆ Heparina (Heparina Rovi 5%<sup>®</sup>).
- ◆ Embutramida (T-61<sup>®</sup>).
- ◆ Solución inyectable de enrofloxacino (Syvaquinol<sup>®</sup>, Laboratorios SYVA).
- ◆ Pomada intramamaria de enrofloxacino al 20% (Laboratorios SYVA).
- Mango de bisturí n°4 y hojas de bisturí n°24.
- Tijera de Mayo.

- Tijera de Metzenbaum.
- Portaagujas de Mayo-Hegar.
- Pinzas de disección (con dientes y sin dientes).
- Pinzas hemostáticas: Mosquitos.
- Pinzas de campo Backhaus y Cangrejos.
- Material de sutura no absorbible: Seda (0, 1, 3/4).
- Catéter intravenoso: 14 GA (2,1 x 45 mm) (BD Insyte™).
- Jeringuillas (50 ml, 20 ml, 10 ml, 5 ml, 2 ml) y agujas .
- Soporte metálico.
- Llave de tres vías o T.
- Sistema de suero.
- Vaso de precipitado (4L).
- Varilla de vidrio.
- Cuchilla, gasas, esparadrapo y alcohol al 96%.
- Pipetas Pasteur de vidrio (Krape, S.A).
- Tubos de polipropileno de 1,5 ml de capacidad (Treff AG).
- Termómetro (Inserbo).
- Balanza de precisión AyD ER-120a.
- Bomba peristáltica (Percom-I).
- Monitor de presiones (hp Hewlett Packard Model 66S) y transductor.
- Baño térmico (Bunsen TFB).
- Bombona mezcla gases (95 % O<sub>2</sub> y 5 % CO<sub>2</sub>) (Carbueros Metálicos S.A.).

## *Material y métodos*

- Congelador -80°C (MDF-V7386S Sanyo).
- Congelador -20°C (Iarp).
- Centrífuga modelo H-103N (Kokusan).
- pH/mV-metro modelo micropH 2000 (Crison).
- Accutrend Sensor (Roche).
- Cobas Integra 400 (Roche).

## 4. MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DEL ENROFLOXACINO

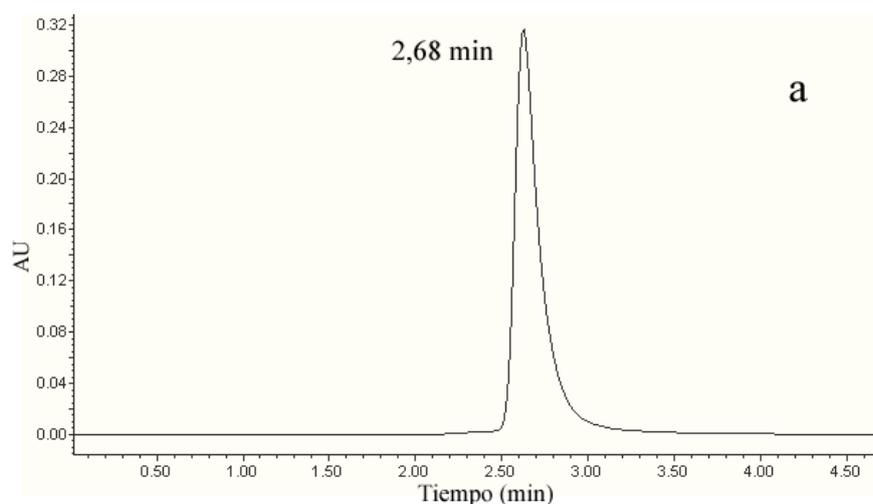
### 4.1. TÉCNICA

La identificación y cuantificación del enrofloxacinó presente en las distintas muestras, se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en fase reversa con detector de ultravioleta (UV).

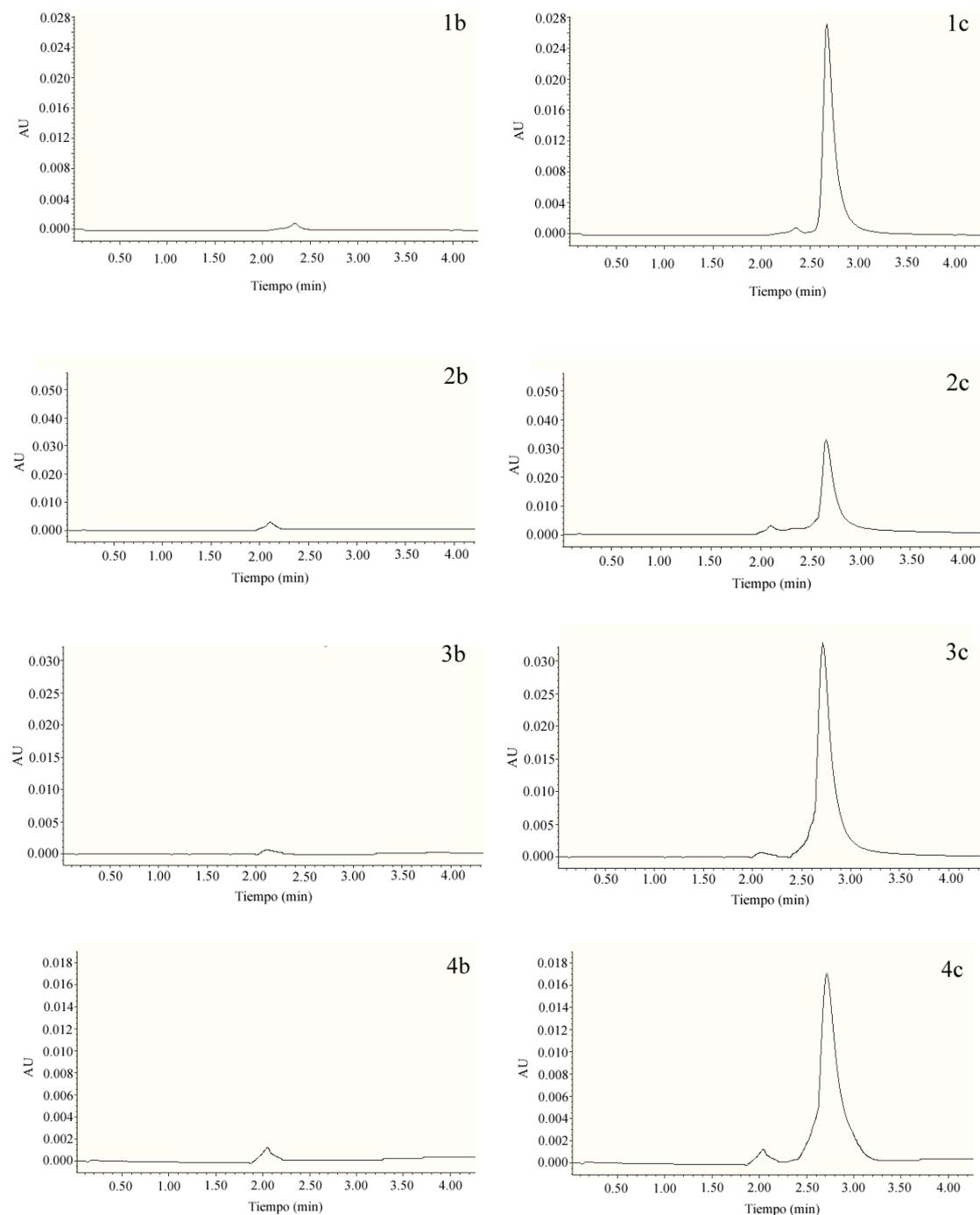
Las condiciones operativas fueron las siguientes:

- ◆ Longitud de onda del detector: 278 nm.
- ◆ Flujo: 1ml/min.
- ◆ Fase móvil: mezcla de una disolución de acetato sódico 0,1 M y acetonitrilo en la proporción 60/40 (v/v), ajustado el pH a 5 con la adición de ácido acético glacial.
- ◆ Columna Nova-Pak<sup>®</sup> C<sub>18</sub> de 4,6 x 250 mm (Waters).

Bajo estas condiciones, el tiempo de retención del enrofloxacinó fue de 2,68 min aproximadamente (figura 31), sin que la presencia de heparina, propofol o embutramida creara interferencias.



**Figura 31.** Cromatograma obtenido tras la inyección de: a) patrón de enrofloxacinó (10 µg/ml).



**Figura 31 (continuación).** Cromatograma obtenido tras la inyección de: 1b) sol. Tyrode blanco tras extracción; 2b) tejido mamario blanco tras extracción; 3b) plasma blanco tras extracción; 4b) leche blanco tras extracción; 1c) patrón de enrofloxacino (10  $\mu\text{g/ml}$ ) en sol. Tyrode tras extracción; 2c) patrón de enrofloxacino (10  $\mu\text{g/ml}$ ) en tejido mamario tras extracción; 3c) patrón de enrofloxacino (10  $\mu\text{g/ml}$ ) en plasma tras extracción; 4c) patrón de enrofloxacino (10  $\mu\text{g/ml}$ ) en leche tras extracción.

## 4.2. OBTENCIÓN DE LA RECTA DE CALIBRADO

Para realizar el calibrado, se preparó una disolución inicial de enrofloxacino en fase móvil a una concentración de 1 mg/ml. A partir de ella, y diluyendo con fase móvil, se prepararon 11 disoluciones patrón a las concentraciones de 100; 50, 20; 10; 5; 2; 1; 0,8; 0,5; 0,2 y 0,1 µg/ml. Debido a que se inyectaba un volumen fijo de 50 µl, las cantidades de enrofloxacino inyectadas fueron 5; 2,5; 1; 0,5; 0,25; 0,1; 0,05; 0,04; 0,025; 0,01 y 0,005 µg.

La mejor correlación entre la concentración de enrofloxacino y la altura del pico (tabla 7) se obtenía si se consideraban dos líneas rectas. La primera de ellas, de ecuación:

$$y = 109,16 + 16779,54 x \quad (r^2 = 0,9981) \quad (p < 0,001)$$

se aplicaba en el intervalo de concentraciones de 0,1 a 1 µg/ml.

La segunda recta, de ecuación:

$$y = -10913,63 + 17655,71 x \quad (r^2 = 0,9992) \quad (p < 0,001)$$

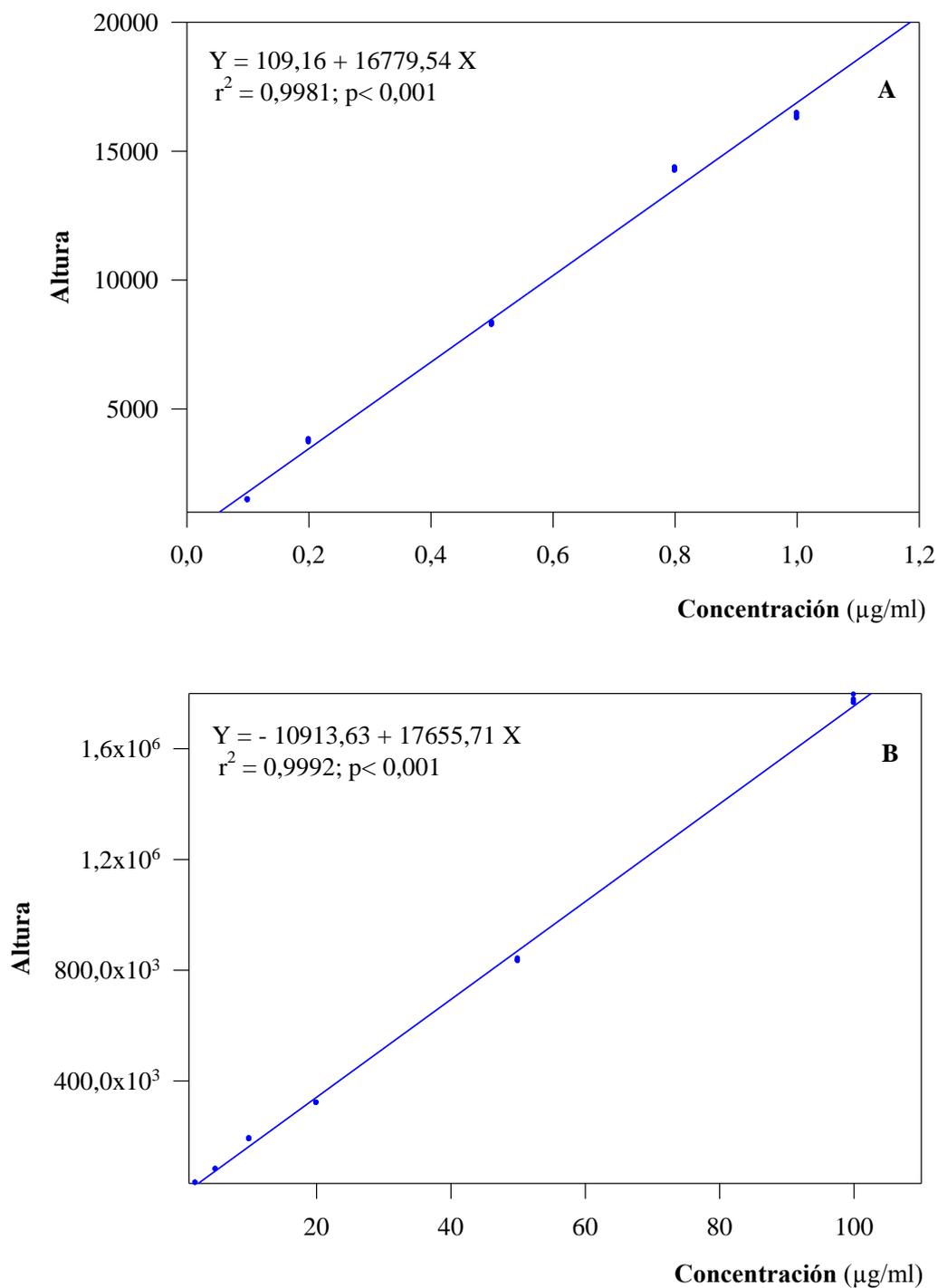
se utilizaba en el intervalo de concentraciones de 2 a 100 µg/ml.

Con estas condiciones de trabajo, la concentración mínima cuantificada se situó en 0,08 µg/ml.

**Tabla 7.** Condiciones iniciales de calibrado (patrones de enrofloxacinó en fase móvil).

Concentración de la disolución inyectada (µg/ml)	Altura del pico	$\bar{x} \pm DE$	Coefficiente de Variación (%)
0,1	1444	1472,60 ± 17,73	1,20
	1487		
	1469		
	1476		
	1487		
0,2	3693	3759,00 ± 50,49	1,34
	3728		
	3793		
	3761		
	3820		
0,5	8246	8297,00 ± 48,63	0,59
	8279		
	8264		
	8359		
	8337		
0,8	14236	14277,20 ± 52,78	0,37
	14232		
	14258		
	14357		
	14303		
1	16472	16366,80 ± 91,33	0,56
	16441		
	16261		
	16292		
	16368		
2	31151	31150,60 ± 113,03	0,36
	31111		
	31041		
	31110		
	31340		
5	80139	80146,20 ± 432,40	0,54
	79744		
	80220		
	79802		
	80826		
10	190936	190153,80 ± 1677,28	0,88
	188066		
	189321		
	189938		
	192508		
20	320348	320104,60 ± 788,27	0,25
	320240		
	321180		
	319689		
	319066		
50	832439	835583,80 ± 4015,80	0,48
	841758		
	834379		
	837258		
	832085		
100	1794445	1774608,00 ± 12477,85	0,70
	1772296		
	1764452		
	1764081		
	1777766		

$\bar{x}$  = media, DE = desviación estándar.



**Figura 32.** Rectas de calibrado: (A) intervalo entre 0,1 y 1 µg/ml; (B) intervalo entre 2 y 100 µg/ml.

### 4.3. EXACTITUD Y REPRODUCTIBILIDAD DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN

La reproductibilidad y exactitud del método se evaluaron mediante la inyección de varias soluciones patrón los días en que se realizaban los análisis de las distintas muestras. En la tabla 8 se exponen los resultados obtenidos, y se puede observar el bajo coeficiente de variación.

**Tabla 8.** Exactitud y reproductibilidad del método de cuantificación.

Concentración teórica (µg/ml)	Número de muestras	Concentración determinada (µg/ml) $\bar{x} \pm DE$	Coefficiente de variación (%)
0,1	10	0,102 ± 0,006	6,31
0,2	9	0,210 ± 0,011	5,35
0,5	10	0,530 ± 0,028	5,30
0,8	9	0,854 ± 0,042	4,92
1	10	1,023 ± 0,047	4,61
2	10	2,771 ± 0,037	1,32
5	10	5,707 ± 0,364	6,38
10	11	11,05 ± 0,47	4,21
20	9	19,17 ± 0,43	2,25
50	11	48,80 ± 1,10	2,26
100	14	100,31 ± 5,77	5,75

$\bar{x}$  = media, DE = desviación estándar.

### 4.4. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

La extracción del enrofloxacino de las muestras de **solución Tyrode**, **plasma** y **pseudo-leche** se realizó utilizando cartuchos de extracción en fase sólida. Para ello se utilizó un sistema de vacío Manifold de 20 puertos y cartuchos Supelco<sup>TM</sup> C<sub>18</sub> LC-18 SPE (1 ml, Waters Associates, UK).

Antes de proceder a la extracción, tanto las muestras de plasma como de *pseudo-leche* eran desproteinizadas para evitar que los cartuchos se atascaran. Dicho procedimiento no fue necesario en el caso de la solución Tyrode. Para la desproteización, a 1 ml de plasma depositado en un tubo de vidrio, se añadían 0,5 ml de ácido acético al 10%, agitándose posteriormente en un vortex. A continuación, se centrifugaba a 3.000 rpm durante 10 min, extrayendo por aspiración el sobrenadante con una pipeta Pasteur. En el caso de la *pseudo-leche*, el procedimiento era el mismo pero añadiendo 1 ml de ácido acético al 10%.

Una vez preparadas las muestras, se realizaba la extracción en fase sólida según el método descrito por Manceau *et al.*, (1999) con ligeras modificaciones. Previamente a su uso, los cartuchos deben ser acondicionados, para ello se les añadió 2 ml de metanol seguidos de 2 ml de agua bidestilada Mili-Q. Una vez activados, se les añadió la muestra de solución Tyrode (2 ml), plasma o *pseudo-leche* obtenida previamente y se procedió al lavado de los cartuchos. Para ello, se hizo pasar por los cartuchos 0,75 ml de agua bidestilada Mili-Q seguida de 0,5 ml de acetonitrilo, dejando secar a continuación los cartuchos. Finalmente, se procedió a la elución del enrofloxacino del cartucho de extracción añadiendo 1 ml de fase móvil, inyectándose posteriormente en el cromatógrafo.

La extracción y purificación de las muestras de **tejido mamario** se realizó siguiendo el método descrito por Diaz *et al.* (2001) con ligeras modificaciones.

Se procedió a pesar 1 g de tejido mamario, el cual fue troceado e introducido en un tubo de 10 ml. A continuación se le añadieron 4 ml de diclorometano a cada muestra y se homogeneizaron a 13.500 rpm durante 30 seg mediante la ayuda de un biohomogenizador (Ultra Turrax T-25). Al homogenado se le añadieron otros 4 ml de diclorometano y 0,5 ml de buffer de fosfato sódico 0,5 M (pH 7,5). Después del agitado y centrifugado a 2.500 rpm durante 10 min, se recolectó la fase orgánica y se mezcló con 1 ml de hidróxido sódico 0,5 M, sometiéndola posteriormente a centrifugación (2.500 rpm; 10 min). Este último paso se repitió dos veces. Finalmente se recolectó la fase acuosa y se inyectó en el cromatógrafo.

De cada una de las muestras (solución Tyrode, plasma, *pseudo-leche* y tejido mamario) se realizaron dos inyecciones de 50 µl en el cromatógrafo.

#### **4.5. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DEL MÉTODO**

Con el fin de determinar el porcentaje de recuperación de los distintos métodos empleados y partiendo de la disolución inicial de enrofloxacin en fase móvil empleada en el calibrado (1 mg/ml), se prepararon 11 disoluciones patrón que tenían las siguientes concentraciones: 100; 50, 20; 10; 5; 2; 1; 0,8; 0,5; 0,2 y 0,1 µg/ml.

A las muestras de solución Tyrode (1 ml), plasma (1 ml), *pseudo-leche* (1 ml) y tejido mamario (1 g) se le añadieron 100 µl de cada patrón, llevándose a cabo a continuación el método de extracción previamente descrito. Posteriormente, y una vez reconstituidas, se inyectaron en el cromatógrafo de igual forma que el resto de las muestras. En las tablas adjuntas (9, 10, 11 y 12) se reflejan los resultados obtenidos, siendo el porcentaje de recuperación medio para la solución Tyrode del 84,20 %, para el tejido mamario del 73,54 %, para la *pseudo-leche* del 81,41 % y para el plasma del 83,79 %.

**Tabla 9.** Porcentaje de recuperación del enrofloxacino tras el proceso de extracción en muestras de solución Tyrode.

Concentración teórica de Enrofloxacino ( $\mu\text{g/ml}$ )	Número de muestras	Concentración determinada ( $\mu\text{g/ml}$ )	$\bar{x} \pm \text{DE}$	Coefficiente de Variación (%)	Porcentaje de Recuperación (%)
0,1	6	0,093	$0,089 \pm 0,004$	4,90	93,38
		0,090			90,28
		0,083			83,88
		0,084			84,17
		0,093			93,14
		0,092			92,22
0,2	8	0,170	$0,162 \pm 0,008$	5,03	85,26
		0,169			84,52
		0,167			83,93
		0,168			84,25
		0,151			75,97
		0,149			74,51
		0,160			80,42
		0,163			81,52
0,5	8	0,483	$0,456 \pm 0,024$	5,40	96,64
		0,488			97,68
		0,471			94,39
		0,470			94,18
		0,432			86,56
		0,433			86,75
		0,435			87,09
		0,433			86,61
0,8	8	0,672	$0,672 \pm 0,029$	4,33	84,09
		0,682			85,33
		0,686			85,76
		0,690			86,32
		0,696			87,00
		0,695			86,92
		0,628			78,62
		0,624			78,00
1	8	0,845	$0,877 \pm 0,020$	2,31	84,53
		0,852			85,26
		0,879			87,98
		0,874			87,43
		0,881			88,11
		0,879			87,95
		0,901			90,12
		0,902			90,23
2	8	1,693	$1,723 \pm 0,103$	5,99	84,69
		1,675			83,79
		1,792			89,61
		1,795			89,76
		1,579			78,99
		1,590			79,54
		1,835			91,76
		1,829			91,45

$\bar{X}$  = media, DE = desviación estándar.

**Tabla 9 (continuación).** Porcentaje de recuperación del enrofloxacino tras el proceso de extracción en muestras de solución Tyrode.

Concentración teórica de Enrofloxacino ( $\mu\text{g/ml}$ )	Número de muestras	Concentración determinada ( $\mu\text{g/ml}$ )	$\bar{x} \pm \text{DE}$	Coefficiente de Variación (%)	Porcentaje de Recuperación (%)
5	8	4,140	$4,329 \pm 0,201$	4,66	82,80
		4,100			82,01
		4,584			91,68
		4,525			90,51
		4,177			83,54
		4,161			83,23
		4,488			89,76
		4,461			89,23
10	8	8,170	$8,445 \pm 0,335$	3,97	81,70
		8,215			82,15
		8,250			82,50
		8,277			82,77
		8,395			83,95
		8,297			82,97
		8,967			89,67
		8,989			89,89
20	8	17,10	$16,61 \pm 0,72$	4,37	85,51
		17,36			86,82
		15,93			79,68
		16,08			80,40
		17,25			86,25
		17,39			86,98
		16,00			80,04
		15,74			78,73
50	8	39,11	$36,65 \pm 2,05$	5,61	78,23
		39,13			78,27
		37,18			74,36
		36,68			73,36
		34,12			68,25
		34,85			69,71
		34,23			68,46
		37,91			75,82
100	8	80,18	$80,14 \pm 0,35$	0,44	80,18
		80,13			80,13
		80,06			80,06
		79,84			79,84
		79,70			79,70
		80,90			80,90
		80,21			80,21
		80,13			80,13

$\bar{x} \pm \text{DE} = 84,20 \pm 6,12$

$\bar{X}$  = media, DE = desviación estándar.

**Tabla 10.** Porcentaje de recuperación el enrofloxacino tras el proceso de extracción en muestras de tejido mamario.

Concentración teórica de Enrofloxacino ( $\mu\text{g/ml}$ )	Número de muestras	Concentración determinada ( $\mu\text{g/ml}$ )	$\bar{x} \pm \text{DE}$	Coefficiente de Variación (%)	Porcentaje de Recuperación (%)
0,1	8	0,080	$0,079 \pm 0,012$	14,61	80,24
		0,077			77,33
		0,075			74,96
		0,074			73,72
		0,097			97,12
		0,095			94,54
		0,068			67,62
		0,066			65,51
0,2	8	0,139	$0,154 \pm 0,014$	9,11	69,73
		0,135			67,58
		0,146			73,00
		0,146			72,99
		0,165			82,49
		0,158			79,13
		0,171			85,60
		0,170			84,86
0,5	8	0,285	$0,303 \pm 0,014$	4,74	56,96
		0,277			55,32
		0,311			62,10
		0,312			62,45
		0,313			62,63
		0,314			62,86
		0,307			61,36
		0,309			61,74
0,8	8	0,552	$0,545 \pm 0,024$	4,32	69,07
		0,549			68,63
		0,510			63,70
		0,509			63,57
		0,548			68,51
		0,559			69,91
		0,565			70,69
		0,570			71,21
1	8	0,634	$0,668 \pm 0,024$	3,64	63,44
		0,634			63,36
		0,697			69,74
		0,699			69,87
		0,670			67,02
		0,673			67,30
		0,669			66,98
		0,667			66,75
2	6	1,201	$1,258 \pm 0,042$	3,375	60,06
		1,216			60,80
		1,300			65,01
		1,303			65,17
		1,271			63,54
		1,259			62,96

$\bar{X}$  = media, DE = desviación estándar.

**Tabla 10 (continuación).** Porcentaje de recuperación el enrofloxacino tras el proceso de extracción en muestras de tejido mamario.

Concentración teórica de Enrofloxacino ( $\mu\text{g/ml}$ )	Número de muestras	Concentración determinada ( $\mu\text{g/ml}$ )	$\bar{x} \pm \text{DE}$	Coefficiente de Variación (%)	Porcentaje de Recuperación (%)
5	8	4,068	$3,889 \pm 0,100$	2,59	81,36
		4,023			80,46
		3,799			75,98
		3,832			76,64
		3,856			77,12
		3,887			77,74
		3,820			76,39
		3,828			76,57
10	8	8,878	$8,551 \pm 0,357$	4,18	88,78
		8,666			86,66
		8,956			89,56
		8,580			85,80
		8,693			86,93
		8,619			86,19
		8,025			80,25
		7,996			79,96
20	8	16,49	$16,02 \pm 0,27$	1,70	82,46
		16,31			81,56
		16,10			80,50
		16,01			80,06
		15,69			78,45
		15,83			79,15
		15,88			79,38
		15,82			79,11
50	8	43,57	$40,68 \pm 2,33$	5,74	87,13
		44,22			88,45
		38,47			76,94
		38,62			77,23
		38,74			77,48
		39,11			78,22
		42,05			84,11
		40,67			81,34
100	8	67,17	$67,16 \pm 0,08$	0,12	67,17
		67,26			67,26
		67,19			67,19
		67,14			67,14
		67,03			67,03
		67,07			67,07
		67,18			67,18
		67,23			67,23

$\bar{x} \pm \text{DE} = 73,54 \pm 9,14$

$\bar{X}$  = media, DE = desviación estándar.

**Tabla 11.** Porcentaje de recuperación del enrofloxacino tras el proceso de extracción en muestras de *pseudo-leche*.

Concentración teórica de Enrofloxacino ( $\mu\text{g/ml}$ )	Número de muestras	Concentración determinada ( $\mu\text{g/ml}$ )	$\bar{x} \pm \text{DE}$	Coefficiente de Variación (%)	Porcentaje de Recuperación (%)
0,1	6	0,097	$0,093 \pm 0,003$	2,90	97,24
		0,093			93,21
		0,089			89,88
		0,090			90,01
		0,093			92,89
		0,093			92,64
0,2	8	0,194	$0,181 \pm 0,015$	8,24	96,83
		0,194			96,84
		0,196			98,18
		0,196			97,85
		0,168			84,16
		0,169			84,46
		0,167			83,53
		0,164			82,07
0,5	8	0,307	$0,378 \pm 0,067$	17,75	61,41
		0,327			65,31
		0,322			64,44
		0,417			83,25
		0,437			87,32
		0,451			90,15
		0,452			90,32
		0,307			61,44
0,8	8	0,642	$0,618 \pm 0,040$	6,54	80,24
		0,630			78,76
		0,630			78,81
		0,627			78,39
		0,652			81,49
		0,652			81,54
		0,553			69,09
		0,557			69,46
1	8	0,856	$0,858 \pm 0,019$	2,17	85,57
		0,855			85,54
		0,880			88,06
		0,880			88,05
		0,859			85,86
		0,866			86,59
		0,831			83,11
		0,833			83,31
2	6	1,489	$1,487 \pm 0,009$	0,60	74,46
		1,480			73,99
		1,480			74,01
		1,478			73,88
		1,480			74,85
		1,480			74,87

$\bar{x}$  = media, DE = desviación estándar.

**Tabla 11 (continuación).** Porcentaje de recuperación del enrofloxacino tras el proceso de extracción en muestras de *pseudo-leche*.

Concentración teórica de Enrofloxacino (µg/ml)	Número de muestras	Concentración determinada (µg/ml)	$\bar{x} \pm DE$	Coefficiente de Variación (%)	Porcentaje de Recuperación (%)
5	8	4,121	4,049 ± 0,083	2,05	82,42
		4,136			82,71
		4,079			81,58
		4,068			81,36
		4,078			81,55
		4,074			81,48
		3,932			78,63
		3,911			78,21
10	8	8,198	8,276 ± 0,160	1,94	81,98
		8,181			81,81
		8,525			85,25
		8,545			85,45
		8,211			82,11
		8,195			81,95
		8,165			81,65
8,191	81,91				
20	6	16,76	16,86 ± 0,13	0,75	83,82
		16,87			84,33
		16,75			83,75
		16,74			83,71
		17,04			85,20
		16,97			84,87
50	8	38,72	37,19 ± 1,20	3,22	77,45
		38,51			77,02
		36,17			72,34
		36,60			73,21
		35,92			71,84
		35,81			71,62
		37,66			75,32
		38,09			76,19
100	8	79,18	78,99 ± 0,94	1,19	79,18
		79,06			79,06
		78,25			78,25
		78,33			78,33
		77,81			77,81
		78,62			78,62
		80,21			80,21
		80,47			80,47

$\bar{x} \pm DE = 81,41 \pm 7,68$

$\bar{X}$  = media, DE = desviación estándar.

**Tabla 12.** Porcentaje de recuperación de enrofloxacino tras el proceso de extracción en muestras de plasma.

Concentración teórica de Enrofloxacino ( $\mu\text{g/ml}$ )	Número de muestras	Concentración determinada ( $\mu\text{g/ml}$ )	$\bar{x} \pm \text{DE}$	Coefficiente de Variación (%)	Porcentaje de Recuperación (%)
0,1	6	0,094	$0,094 \pm 0,001$	1,14	94,41
		0,094			94,37
		0,095			95,46
		0,095			95,36
		0,093			93,26
		0,093			92,81
0,2	8	0,188	$0,179 \pm 0,014$	7,85	93,94
		0,189			94,74
		0,194			97,15
		0,195			97,32
		0,161			80,42
		0,160			80,22
		0,174			86,80
		0,175			87,28
0,5	6	0,471	$0,423 \pm 0,033$	7,77	94,13
		0,458			91,53
		0,407			81,49
		0,408			81,51
		0,396			79,21
		0,396			79,25
0,8	8	0,734	$0,623 \pm 0,072$	11,59	91,74
		0,738			92,23
		0,604			75,55
		0,602			75,26
		0,555			69,41
		0,556			69,50
		0,598			74,80
		0,599			74,89
		0,599			74,89
1	8	0,818	$0,794 \pm 0,024$	3,02	81,77
		0,820			81,97
		0,806			80,62
		0,804			80,44
		0,757			75,69
		0,760			75,99
		0,793			79,32
		0,795			79,53
2	8	1,604	$1,626 \pm 0,018$	1,13	80,19
		1,616			80,80
		1,651			82,56
		1,610			80,48
		1,609			80,45
		1,642			82,12
		1,640			81,98
		1,638			81,89

$\bar{x}$  = media, DE = desviación estándar.

**Tabla 12 (continuación).** Porcentaje de recuperación de enrofloxacino tras el proceso de extracción en muestras de plasma.

Concentración teórica de Enrofloxacino ( $\mu\text{g/ml}$ )	Número de muestras	Concentración determinada ( $\mu\text{g/ml}$ )	$\bar{x} \pm \text{DE}$	Coefficiente de Variación (%)	Porcentaje de Recuperación (%)
5	8	4,627	$4,435 \pm 0,319$	7,20	92,53
		4,611			92,22
		4,579			91,58
		4,555			91,11
		4,645			92,89
		4,623			92,45
		3,921			78,42
		3,918			78,36
10	6	8,065	$8,290 \pm 0,222$	2,68	80,65
		8,015			80,15
		8,300			83,00
		8,290			82,90
		8,525			85,25
		8,547			85,47
20	6	18,31	$18,38 \pm 0,20$	1,11	91,54
		18,09			90,45
		18,23			91,14
		18,62			93,09
		18,52			92,59
		18,53			92,63
50	6	31,75	$38,53 \pm 5,39$	14,01	63,50
		31,77			63,53
		42,93			85,86
		43,72			87,42
		40,32			80,63
		40,68			81,36
100	8	77,43	$76,89 \pm 0,36$	0,47	77,43
		77,01			77,01
		76,73			76,73
		76,72			76,72
		76,57			76,57
		76,55			76,55
		77,44			77,44
		76,68			76,68

$\bar{x} \pm \text{DE} = 83,79 \pm 7,86$

$\bar{x}$  = media, DE = desviación estándar.

#### 4.6. REACTIVOS, MATERIAL Y EQUIPOS EMPLEADOS EN LA CUANTIFICACIÓN DEL ENRFOFLOXACINO

- ◆ Acetonitrilo calidad HPLC (Merck).
- ◆ Ácido acético glacial calidad HPLC (Panreac).
- ◆ Acetato sódico (Probus).
- ◆ Metanol calidad HPLC (Merck).
- ◆ Agua bidestilada Mili-Q (Millipore).
- ◆ Diclorometano calidad HPLC (Merck).
- ◆ Fosfato sódico grado p.a. (BDH Prolabo).
- ◆ Hidróxido sódico grade p.a. (Panreac).
- ◆ Enrofloxacino (Laboratorios SYVA).
- Pipetas Pasteur de vidrio (Krape, S.A).
- Pipeta automática de volumen variable entre 200 y 1000 µl (HTL).
- Pipeta automática de volumen fijo 1000 µl (Fixed Finn).
- Manifold y cartuchos Supelco<sup>TM</sup> C<sub>18</sub> (1ml, Waters Associates, UK).
- Agitador manual (Heidolph).
- pH/mV-metro modelo micropH 2000 (Crison).
- Centrífuga modelo H-103N (Kokusan).
- Biohomogenizador (Ultra Turrax T-25).
- Equipo de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC):
  - Modelo Waters LC Module I Plus.
  - Detector UV/VIS.
  - Inyector automático.

*Material y métodos*

- Columna Nova-Pak<sup>®</sup> C<sub>18</sub> de 4,6 x 250 mm (Waters).
- Sistema de procesador de datos cromatográficos Millennium 32.

## 5. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO

Los datos relativos a las concentraciones en solución Tyrode de enrofloxacino obtenidos a los distintos tiempos de muestreo tras la administración *sistémica*, fueron analizados utilizando el método compartimental y el no compartimental. Este estudio se llevó a cabo tanto con los valores individuales como con las medias de cada grupo de animales.

### 5.1. ANÁLISIS COMPARTIMENTAL

Los datos experimentales individuales de concentración-tiempo y los relativos a las concentraciones medias fueron analizados por un método de regresión no lineal, utilizando el programa WinNonlin<sup>®</sup> versión 5.2.1. En todos los casos, se examinó la correspondencia de los datos con los modelos monocompartmental, bicompartimental y tricompartmental abiertos; definidos por la ecuación poliexponencial:

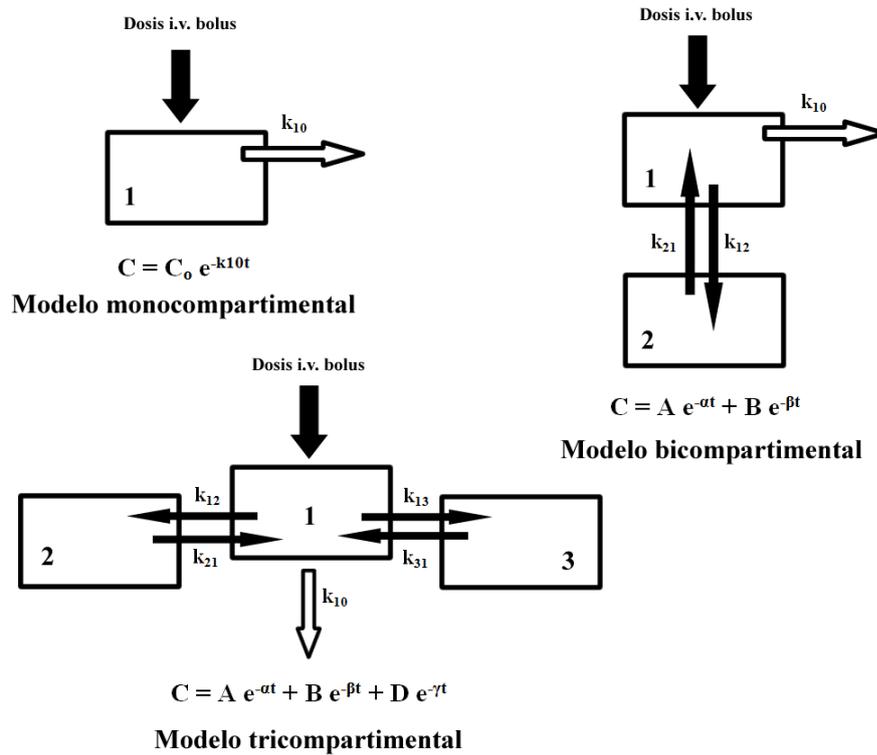
$$C_t = \sum_{i=1}^{i=n} Y_i \exp(-\lambda_i t), \text{ donde}$$

$C_t$  = concentración plasmática del metformina a tiempo  $t$

$Y_i$  = coeficiente del término exponencial  $i$  correspondiente

$\lambda_i$  = exponente del término exponencial  $i$  correspondiente

A continuación se representan los esquemas de cada modelo farmacocinético, así como su ecuación exponencial correspondiente (Figura 33).



**Figura 33.** Esquema de los modelos farmacocinéticos para la vía intravenosa.

Como criterio de ponderación se eligió  $1/C^2$ , donde  $C$  es la concentración experimental de enrofloxacino. Por otra parte, se empleó el criterio de la inspección gráfica de los residuales ponderados, así como el de información de Akaike (AIC) (Yamaoka *et al.*, 1978a) para la selección del modelo que mejor se ajustaba a los datos experimentales (Wagner, 1993; Gabrielson y Weiner, 2007).

El criterio de selección de Akaike viene definido por la expresión:

$$AIC = N \ln R_e + 2p, \text{ donde}$$

$N$  = número de pares de datos experimentales

$R_e$  = residuales ponderados al cuadrado

$p$  = número de parámetros que definen el modelo

Para el cálculo de los restantes parámetros compartimentales se utilizaron los valores de los coeficientes y de las constantes optimizados por el WinNonlin<sup>®</sup>, utilizando las fórmulas clásicas descritas por Gibaldi y Perrier (1982) y Wagner (1993).

## 5.2. ANÁLISIS NO COMPARTIMENTAL

Los parámetros farmacocinéticos no compartimentales fueron analizados asimismo utilizando el programa WinNonlin<sup>®</sup>. Para el cálculo de los distintos parámetros, este programa utiliza las ecuaciones de la teoría de los momentos estadísticos (Cutler *et al.*, 1978; Yamaoka *et al.*, 1978b; y Benet y Galeazzi, 1979) y las descritas por Gibaldi y Perrier (1982) y Wagner (1993) cuyas expresiones se exponen a continuación.

El área bajo la curva concentración-tiempo (AUC) se calculó como:

$$AUC = AUC_{0-t} + AUC_{t-\infty}, \text{ donde}$$

$AUC_{0-t}$  = área bajo la curva concentración-tiempo desde el tiempo 0 hasta el último tiempo experimental, calculándose por la regla trapezoidal lineal, y

$AUC_{t-\infty}$  = área bajo la curva concentración-tiempo desde el último punto experimental hasta infinito y se calculó como:

$$\frac{C_t}{\lambda}, \text{ donde}$$

$C_t$  = concentración en el último tiempo experimental y

$\lambda$  = pendiente de la fase final recta de la curva logaritmo concentración-tiempo, y que fue calculada por regresión lineal por mínimos cuadrados.

Para determinar el área bajo la curva del primer momento estadístico (AUMC) se utilizó la expresión:

$$\text{AUMC} = \text{AUMC}_{0-t} + \text{AUMC}_{t-\infty}, \text{ donde}$$

$\text{AUMC}_{0-t}$  = área bajo la curva del primer momento estadístico desde el tiempo 0 al último tiempo experimental. Se calculó por la regla trapezoidal lineal y

$\text{AUMC}_{t-\infty}$  = área bajo la curva del primer momento estadístico desde el último tiempo experimental hasta infinito y se determinó mediante la expresión:

$$\text{AUMC}_{t-\infty} = \frac{C_t t}{\lambda} + \frac{C_t}{\lambda^2}, \text{ donde}$$

t = último tiempo experimental

El tiempo de residencia medio (MRT) se obtuvo a partir de la siguiente expresión:

$$\text{MRT} = \text{AUMC}/\text{AUC}$$

El aclaramiento (Cl) se calculó como:

$$\text{Cl} = D/\text{AUC}, \text{ donde}$$

D = dosis administrada

El volumen de distribución en el estado de equilibrio ( $V_{ss}$ ), como:

$$V_{ss} = \text{MRT} \cdot D/\text{AUC}$$

El volumen de distribución en función del área ( $V_a$ ), como:

$$V_a = \text{Cl}/\lambda$$

La vida media de  $\lambda$  ( $t_{1/2\lambda}$ ) como:

$$t_{1/2\lambda} = \frac{0,693}{\lambda}$$

## 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para cada conjunto de datos se determinó la normalidad mediante el test de asimetría y la uniformidad de la varianza con el test de Levene. Si los datos cumplían estas dos condiciones se realizaba el análisis de la varianza para muestras repetidas (ANOVA de 2 vías). Cuando las diferencias entre los grupos de datos eran significativas, se utilizó el test de Duncan para hallar entre qué pares se producían dichas diferencias. Si no había normalidad y/o uniformidad de varianza se realizaba el correspondiente test no paramétrico (test de Friedman), y para establecer entre qué pares de datos se producían las diferencias se empleó el test de Wilcoxon. Las diferencias entre los parámetros compartimentales y no compartimentales se determinó mediante el test *t*. En todos los casos se utilizó como nivel de significación el de  $p \leq 0,05$ .

## 7. PROGRAMAS UTILIZADOS EN EL ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO Y ESTADÍSTICO.

Los programas utilizados fueron:

- Sistema de procesado de datos cromatográficos Millenium 32.
- Hoja de cálculo: Microsoft<sup>®</sup> Excel 2000.
- Programa para estudios farmacocinéticos: WinNonlin<sup>®</sup> 5.2.1.
- Programa gráfico: Sigma Plot<sup>®</sup> para Windows, versión 9.0.
- Programas estadísticos: SPPS Statistics para Windows, versión 17.0.



# ***RESULTADOS Y DISCUSIÓN***



La secuencia de presentación de resultados obtenidos en el ensayo se hará de acuerdo con el siguiente esquema:

1. Modelo *in vitro* de ubre ovina perfundida

1.1. Estudio de viabilidad del modelo

1.1.1. Parámetros bioquímicos

1.1.2. Valoración macroscópica

1.1.3. Estudio histológico

1.2. Administración *sistémica* de enrofloxacino

1.2.1. Solución Tyrode

1.2.2. Tejido mamario

1.3. Administración intramamaria de enrofloxacino

1.3.1. Solución Tyrode

1.3.2. Tejido mamario

2. Ovejas vivas

2.1. Administración intramamaria de enrofloxacino

2.1.1. Plasma

2.1.2. Tejido mamario

3. Relación farmacocinética/farmacodinamia (Pk/Pd)

## 1. Modelo *in vitro* de ubre ovina perfundida

### 1.1. Estudio de viabilidad del modelo

Para determinar la viabilidad del tejido mamario perfundido, y de acuerdo con los estudios previamente publicados (Kietzmann *et al.*, 1993; Ehinger y Kietzmann 2000a y b; Ehinger *et al.*, 2006; Kietzmann *et al.*, 2008), se analizaron dos parámetros bioquímicos: glucosa y lactato en la solución Tyrode. Asimismo, se determinó el pH de la solución a los distintos tiempos de muestreo. Durante todo el periodo de perfusión se llevó a cabo una valoración macroscópica de la glándula mamaria acompañada posteriormente, de un estudio histológico del tejido.

#### 1.1.1. Parámetros bioquímicos

En la tabla 13 se recogen los valores de concentración de glucosa (mg/dl) en solución Tyrode obtenidos a los distintos tiempos de muestreo, con sus medias ( $\bar{x}$ ), desviaciones estándar (DE) y coeficientes de variación (CV) para cada una de las ovejas.

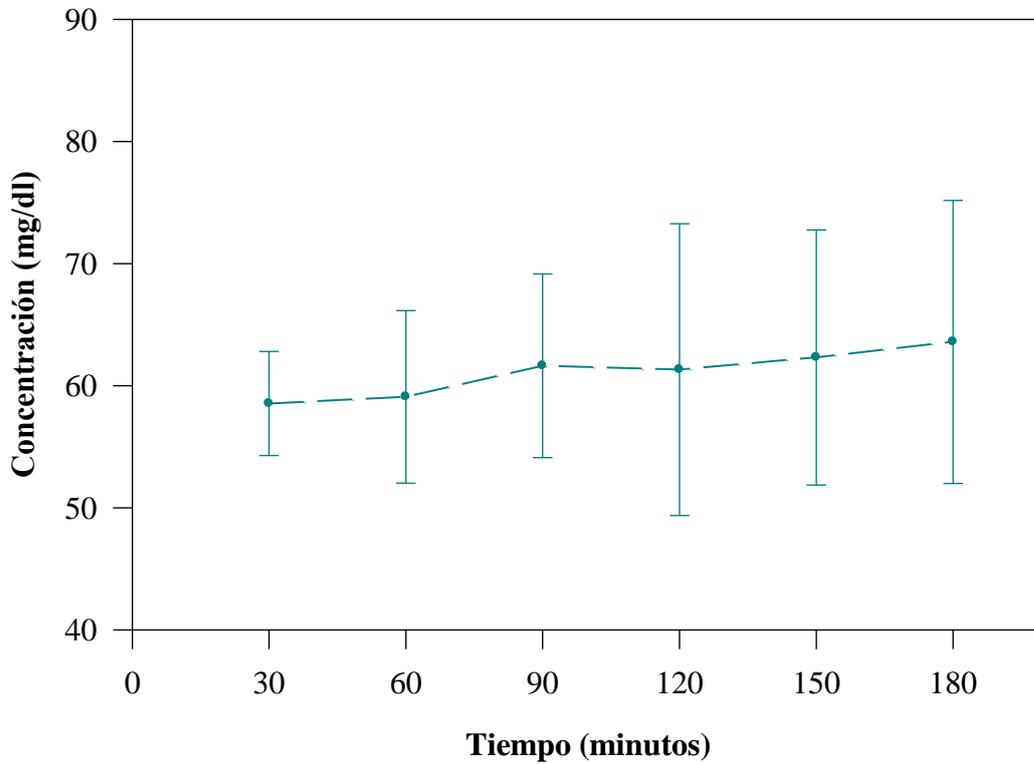
A continuación, en la figura 34 se muestra la evolución de las concentraciones medias de glucosa frente al tiempo obtenidas a lo largo del periodo de perfusión.

Como puede observarse, los valores medios oscilaron entre 58,54 y 63,58 mg/dl, situándose dentro del rango fisiológico normal de la especie ovina (44,0 a 81,2 mg/dl) (Kahn, 2008). Estas variaciones en las concentraciones medias de glucosa a lo largo del periodo de perfusión no resultaron significativas (Test de Friedman,  $p \leq 0,05$ ). El mantenimiento de los niveles de glucosa se considera un indicador de viabilidad del modelo *in vitro* de ubre perfundida, tal y como propusieron Kietzmann *et al.* en 1993 y Ehinger y Kietzmann en 2000a y b.

**Tabla 13.** Concentraciones de glucosa (mg/dl) en solución Tyrode.

Nº oveja	Tiempo (minutos)						
	30	60	90	120	150	180	
1	56	68	76	87	84	88	
2	57	58	58	68	71	79	
3	54	52	56	56	54	58	
4	54	58	62	64	56	55	
5	58	55	54	56	52	54	
6	58	59	62	54	67	63	
7	60	58	62	51	51	54	
8	64	49	62	59	59	54	
9	66	64	61	66	65	74	
10	48	49	47	43	46	49	
11	59	36	59	46	57	55	
12	58	59	58	61	59	56	
13	58	64	66	62	63	59	
14	57	62	69	59	62	65	
15	61	59	57	54	55	59	
16	62	63	64	64	64	66	
17	58	60	58	62	60	63	
18	61	62	56	60	64	59	
19	53	63	60	60	63	62	
20	63	62	59	55	56	60	
21	55	60	59	52	57	56	
22	58	67	79	88	89	91	
23	60	65	64	66	69	70	
24	69	71	80	93	85	89	
25	57	58	54	54	58	62	
26	58	55	60	54	54	53	
	$\bar{X}$	58,54	59,08	61,62	61,31	62,31	63,58
	DE	4,26	7,07	7,52	11,95	10,45	11,60
	CV (%)	7,28	11,97	12,20	19,48	16,76	18,25

$\bar{X}$  = media, DE = desviación estándar, CV = coeficiente de variación.



**Figura 34.** Evolución de las concentraciones medias de glucosa en solución Tyrode a lo largo del periodo de perfusión, en 26 ovejas.

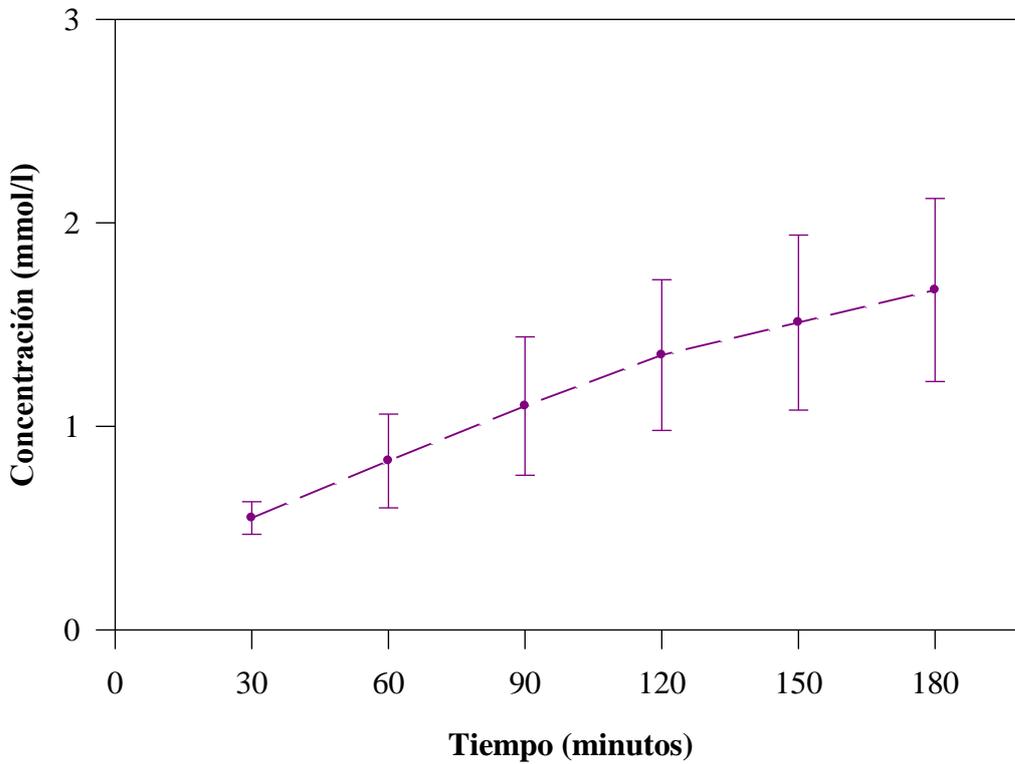
La tabla 14 recoge los valores de concentración de lactato obtenidos a lo largo del periodo de perfusión y medidos a los distintos tiempos de muestreo para cada una de las ovejas, con sus medias ( $\bar{x}$ ), desviaciones estándar (DE) y coeficientes de variación (CV). Asimismo, en la figura 35 se puede observar la evolución de las concentraciones medias de lactato frente al tiempo.

Los valores medios obtenidos oscilaron entre los 0,55 mmol/l (30 min) y 1,67 mmol/l (180 min). Todos los valores, tanto individuales como medios, se encuentran dentro del rango de normalidad para la especie animal en estudio (0,5 a 2,4 mmol/l) (Tietz, 1995), constituyendo este hecho el segundo indicador de viabilidad del modelo *in vitro* (Kietzmann *et al.*, 1993; Ehinger y Kietzmann, 2000a y b).

**Tabla 14.** Concentraciones de lactato (mmol/l) en solución Tyrode.

N° oveja	Tiempo (minutos)						
	30	60	90	120	150	180	
1	0,59	0,97	1,35	1,66	1,88	2,05	
2	0,51	0,72	0,85	1,18	1,51	1,84	
3	0,50	0,56	1,11	1,18	1,58	1,98	
4	0,53	0,94	1,23	1,58	1,76	1,63	
5	0,73	1,29	1,61	1,93	2,14	2,23	
6	0,50	0,52	0,79	1,13	0,89	0,83	
7	0,51	0,47	0,65	1,42	1,67	1,96	
8	0,72	1,31	1,79	2,08	2,22	2,36	
9	0,54	0,55	0,46	0,78	1,28	1,35	
10	0,67	1,03	1,49	1,71	1,71	1,83	
11	0,63	1,13	1,54	1,81	2,00	2,18	
12	0,52	0,98	1,23	1,32	1,41	1,45	
13	0,48	0,80	0,60	0,75	0,64	1,66	
14	0,51	0,60	0,97	1,12	1,45	1,35	
15	0,52	0,75	0,96	1,13	1,79	2,02	
16	0,42	0,80	1,27	0,98	0,72	0,57	
17	0,50	0,56	0,61	0,70	0,63	0,93	
18	0,61	1,04	1,39	1,69	1,77	1,84	
19	0,51	0,74	1,01	1,24	1,41	1,52	
20	0,54	0,71	0,96	1,17	1,33	1,42	
21	0,54	1,09	1,48	1,88	2,04	2,34	
22	0,48	0,83	1,14	1,39	1,67	1,8	
23	0,52	0,70	0,96	1,14	1,33	1,49	
24	0,55	0,96	1,27	1,55	1,74	1,92	
25	0,51	0,74	0,98	1,10	1,34	1,48	
26	0,65	0,82	0,95	1,35	1,32	1,46	
	$\bar{x}$	0,55	0,83	1,10	1,35	1,51	1,67
	DE	0,08	0,23	0,34	0,37	0,43	0,45
	CV (%)	13,76	27,70	30,63	27,44	28,62	26,80

$\bar{x}$  = media, DE = desviación estándar, CV = coeficiente de variación.



**Figura 35.** Evolución de las concentraciones medias de lactato en solución Tyrode a lo largo del periodo de perfusión, en 26 ovejas.

A lo largo del periodo de perfusión, y tal y como puede apreciarse en la figura 35, se observa un aumento en la concentración de lactato en solución Tyrode, y por lo tanto en la producción del mismo. El estudio estadístico realizado indicó que había diferencias significativas entre las concentraciones medias de lactato obtenidas a los diferentes tiempos de muestreo (Anova de 2 vías y Test de Duncan,  $p \leq 0,05$ ).

Si comparamos nuestros resultados de lactato, con los señalados por otros autores (Kietzmann *et al.*, 1993; Ehinger *et al.*, 2006; Kietzmann *et al.*, 2008) podemos observar una pequeña diferencia. Mientras que en nuestro caso, los valores iniciales de lactato son bajos y aumentan a medida que se prolonga el periodo de perfusión, en los estudios anteriormente citados se observan concentraciones iniciales de lactato elevadas. Este hecho es achacable presumiblemente a las condiciones anaeróbicas a las cuales se somete la glándula mamaria durante el

periodo de transporte desde el matadero a la sala de montaje. Dicho transporte no existe en nuestro caso ya que la disección de la glándula mamaria y el montaje de la misma se realizan en salas anexas.

Finalmente en la tabla 15, se muestran los valores, tanto individuales como medios, de pH obtenidos a los distintos tiempos de muestreo establecidos, con sus medias ( $\bar{x}$ ), desviaciones estándar (DE) y coeficientes de variación (CV) para cada una de las ovejas.

Por su parte, la figura 36 muestra la evolución de los valores medios de pH frente al tiempo en las 26 ovejas estudiadas.

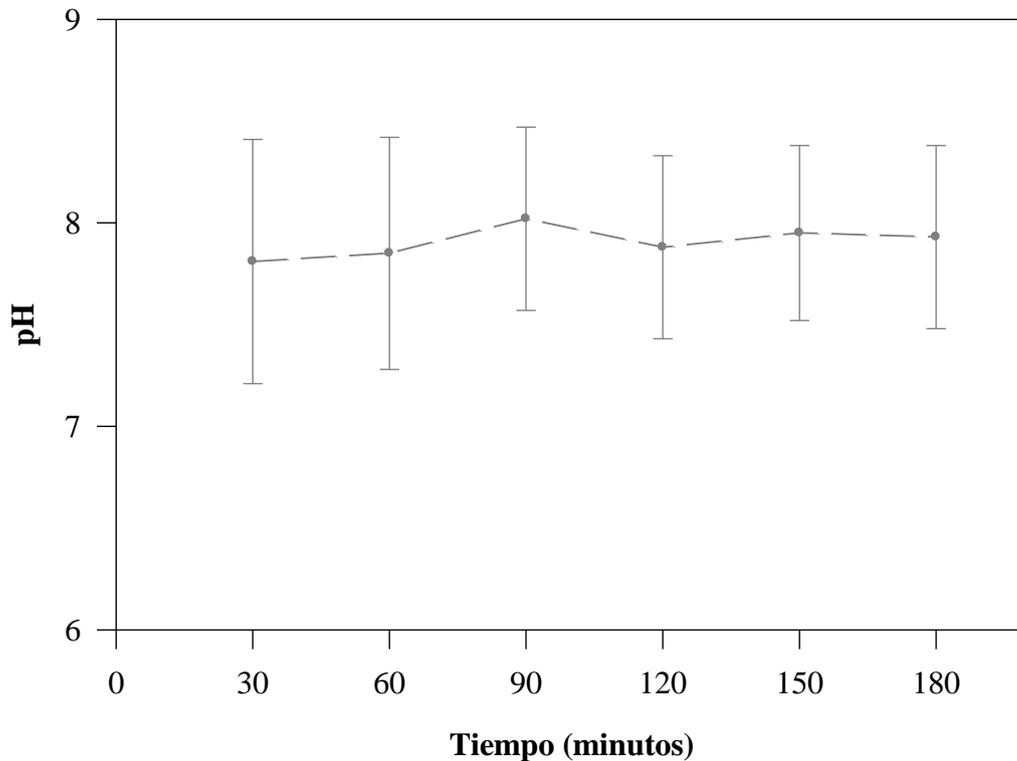
Tal y como muestra la tabla 15, los valores medios de pH obtenidos fueron 7,81 (30 min); 7,85 (60 min); 8,02 (90 min); 7,88 (120 min); 7,95 (150 min) y 7,93 (180 min). No hubo diferencias significativas (Anova de 2 vías,  $p \leq 0,05$ ) entre los valores medios encontrados a los distintos tiempos de muestreo, lo cual se corresponde con lo indicado anteriormente por otros autores (Kietzmann *et al.*, 1993; Ehinger y Kietzmann, 2000a y b; Ehinger *et al.*, 2006; Kietzmann *et al.*, 2008) y supone otro indicador más de viabilidad del modelo.

Cabe señalar que el pH inicial de la solución Tyrode es de 7,4. Si comparamos este dato con el valor de pH obtenido a los 30 min (7,81), podemos observar un ligero aumento. Este hecho tiene su explicación en los reajustes que se producen tanto en el pH como en los diversos parámetros bioquímicos al sustituirse la sangre por la solución de perfusión.

Tabla 15. pH de la solución Tyrode.

Nº oveja	Tiempo (minutos)						
	30	60	90	120	150	180	
1	7,70	7,82	7,95	7,72	7,69	7,68	
2	6,66	7,27	7,69	7,81	8,43	8,44	
3	8,44	8,51	8,59	8,37	8,43	8,38	
4	7,00	7,37	7,67	7,52	7,84	7,96	
5	7,94	7,92	7,89	7,82	7,81	7,81	
6	8,56	6,50	8,03	7,05	7,97	8,06	
7	8,13	8,02	7,96	7,84	7,58	7,45	
8	8,06	7,30	7,88	7,89	7,73	7,75	
9	8,07	7,65	7,97	8,54	7,93	7,96	
10	7,50	7,88	7,43	7,78	7,61	7,84	
11	8,04	7,86	7,93	7,49	7,84	7,75	
12	7,24	7,45	7,61	7,62	7,98	7,78	
13	8,58	8,19	8,50	8,27	8,23	7,92	
14	8,30	8,41	7,96	8,17	8,21	8,43	
15	8,70	8,68	8,76	8,48	8,48	8,37	
16	7,72	7,65	6,73	7,18	6,7	6,84	
17	7,31	8,56	8,54	8,52	8,44	8,46	
18	7,50	8,07	7,92	7,86	7,78	7,82	
19	8,21	8,41	8,42	8,48	8,49	8,50	
20	7,29	6,79	8,15	7,80	8,00	7,82	
21	8,47	8,17	8,37	8,14	8,2	8,25	
22	7,98	8,28	8,14	8,22	8,35	8,11	
23	8,46	8,18	8,25	8,18	8,30	8,41	
24	6,79	8,54	8,65	7,00	7,13	6,74	
25	6,89	7,11	7,33	7,24	7,63	7,75	
26	7,50	7,48	8,21	7,97	7,89	7,89	
	$\bar{x}$	7,81	7,85	8,02	7,88	7,95	7,93
	DE	0,60	0,57	0,45	0,45	0,43	0,45
	CV (%)	7,66	7,24	5,65	5,72	5,37	5,62

$\bar{x}$  = media, DE = desviación estándar, CV = coeficiente de variación.



**Figura 36.** Evolución de los valores medios de pH en solución Tyrode a lo largo del periodo de perfusión, en 26 ovejas.

### 1.1.2. Valoración macroscópica

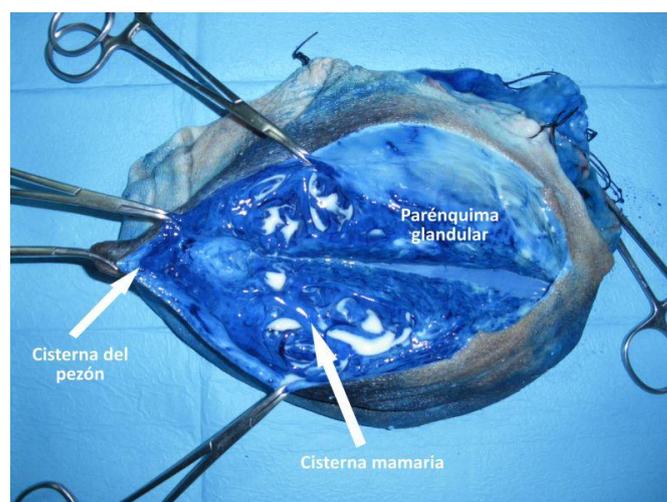
En la tabla 16 se muestran los valores individuales de presión de perfusión así como, de la temperatura de la solución Tyrode, tanto en el momento de entrada en la glándula mamaria, como en el momento de salida. Estos valores van acompañados de la media ( $\bar{x}$ ), desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV).

En 1993, Kietzmann *et al.* utilizaron en sus estudios con ubre bovina un flujo de perfusión que oscilaba entre 60 y 100 ml/min (presión de perfusión, 80 a 100 mmHg). Aunque dicho flujo era inferior al observado en animales vivos lo consideraron adecuado en base a los ensayos que realizaron previamente (Kietzmann, datos no publicados), para obtener una adecuada perfusión dérmica.

En el caso de Zeitlin y Eshraghi (2002) el flujo de perfusión osciló entre los 110 y los 150 ml/min, obteniéndose presiones de perfusión de 85 mmHg, presión arterial media en los bovinos adultos (Olsen y Booth, 1971).

En nuestro caso en particular, el flujo de perfusión osciló entre 60 y 70 ml/min obteniéndose una presión de perfusión comprendida entre los 51 y 59 mmHg, siendo la media de  $56,15 \pm 2,38$  mmHg. Dichos valores coinciden con los señalados recientemente por Kietzmann *et al.* en 2008, en ubres bovinas perfundidas. Aunque como se puede observar, la presión alcanzada en el modelo *in vitro* resulta inferior a la presión fisiológica *in vivo* (80 a 100 mmHg) (Cunningham y Klein, 2009), se ha demostrado que el flujo de perfusión es suficiente para que el líquido llegue a todos los vasos sanguíneos, incluso a los vasos subcutáneos. Para demostrar este hecho, se procedió a realizar la prueba del Trypan azul al 1% (figura 37) que ha sido descrita en el apartado de material y métodos, y en la que se observa la tinción de todo el parénquima mamario así como de los vasos dérmicos subcutáneos.

En cuanto a la temperatura de la solución Tyrode medida a nivel del recipiente de recirculación de 4 litros, se obtuvieron valores que oscilaron entre 39,4 y 40,4°C, coincidiendo estos con los señalados por Ehinger y Kietzmann (2000b). Por su parte, la temperatura de salida osciló entre 34,5 y 35,2°C.



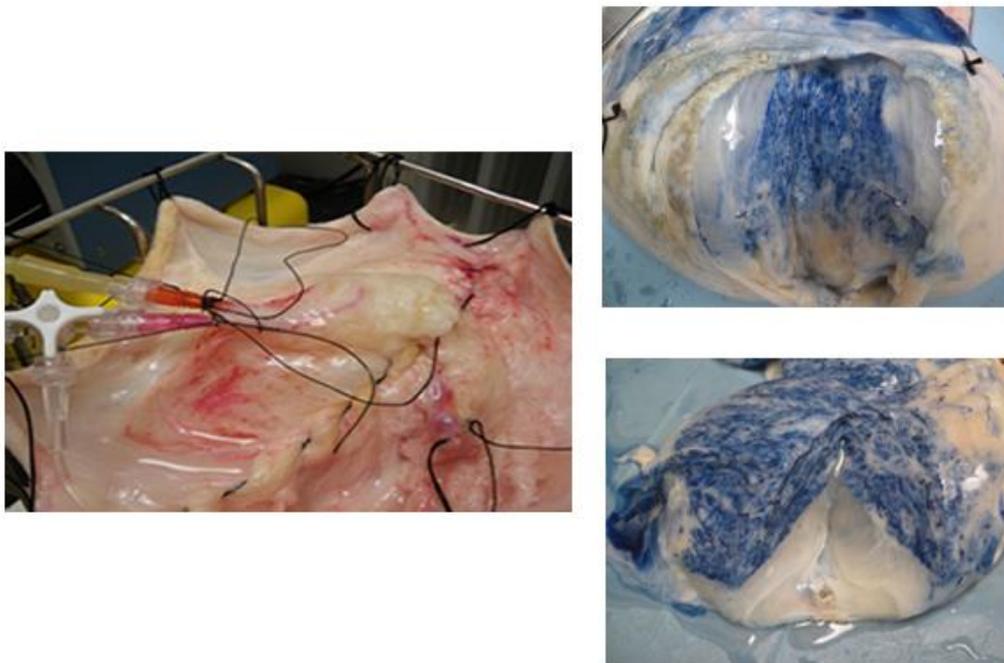
**Figura 37.** Prueba de Trypan azul positiva.

**Tabla 16.** Presiones de perfusión y temperatura de la solución Tyrode.

Nº oveja	Presiones (mmHg)	Temperatura (°C)		
		de entrada	de salida	
1	54	40,4	34,8	
2	56	40,0	35,1	
3	58	39,7	34,6	
4	59	39,7	34,7	
5	58	39,4	34,9	
6	51	40,0	34,5	
7	57	39,5	34,9	
8	56	40,0	34,8	
9	58	39,8	34,6	
10	56	39,6	34,5	
11	57	39,8	34,8	
12	54	39,8	34,6	
13	54	40,0	34,7	
14	52	39,8	35,1	
15	57	39,9	34,9	
16	58	39,9	34,7	
17	59	40,0	35,1	
18	57	39,7	35,2	
19	54	40,0	34,9	
20	52	40,1	34,9	
21	56	39,9	35,0	
22	56	39,8	34,8	
23	59	40,1	34,9	
24	59	39,9	34,7	
25	54	39,8	34,7	
26	59	39,7	34,9	
	$\bar{X}$	56,15	39,86	34,82
	DE	2,38	0,21	0,19
	CV (%)	4,23	0,53	0,54

$\bar{X}$  = media, DE = desviación estándar, CV = coeficiente de variación.

Durante todo el periodo de perfusión se valoró además la formación macroscópica de edema. Una vez finalizado dicho periodo se procedió a realizar la prueba del Trypan azul y a la valoración macroscópica del aspecto del tejido glandular perfundido. En el caso de una glándula mamaria perfundida viable para el estudio se observa ausencia de edema subcutáneo, así como una tinción adecuada del parénquima mamario, incluyendo la cisterna mamaria y la cisterna del pezón (figura 37).



**Figura 38.** Edema macroscópico.

Por su parte, en la figura 38 puede observarse una glándula mamaria perfundida utilizada en los estudios previos llevados a cabo para desarrollar la metodología con gran cantidad de edema subcutáneo. En este caso en particular, el flujo de salida del líquido de perfusión disminuyó a medida que el tiempo transcurría, produciéndose la acumulación del mismo y el consecuente incremento de tamaño de la ubre. También se observó una gran extravasación de líquido. Una vez finalizado el periodo de perfusión, y al igual que se realizó en el resto de las ubres, se

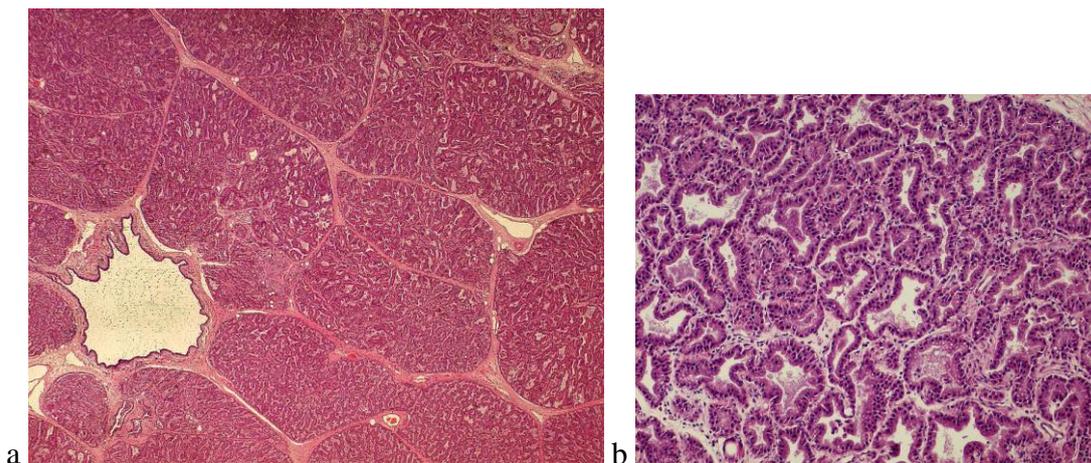
procedió a realizar la prueba del Trypan azul, observándose una escasa o inexistente coloración del parénquima mamario, así como, de la cisterna mamaria y del pezón, indicando que no había una irrigación adecuada. Además, tras analizar los parámetros bioquímicos indicadores de viabilidad (glucosa y lactato), se observó que los distintos valores obtenidos no se encontraban dentro de los rangos fisiológicos correspondientes.

### 1.1.3. Estudio histológico

En las figuras 39 y 40 pueden observarse dos cortes histológicos de glándula mamaria en lactación después del ordeño. La figura 39 muestra tejido glandular perfundido, es decir después de las 3 horas de ensayo, y la figura 40 muestra tejido glandular no perfundido, es decir tejido obtenido inmediatamente después de la eutanasia de la oveja. En ambos casos y a un aumento de 3,87x, se identifican lobulillos mamarios muy aumentados de tamaño, separados entre sí por delgados septos de tejido conectivo en los que se observan conductos interlobulillares. En el interior de los lobulillos se diferencian numerosos alvéolos que muestran luces irregulares (típicas tras el ordeño), ocasionalmente distendidas por la acumulación de producto de secreción.

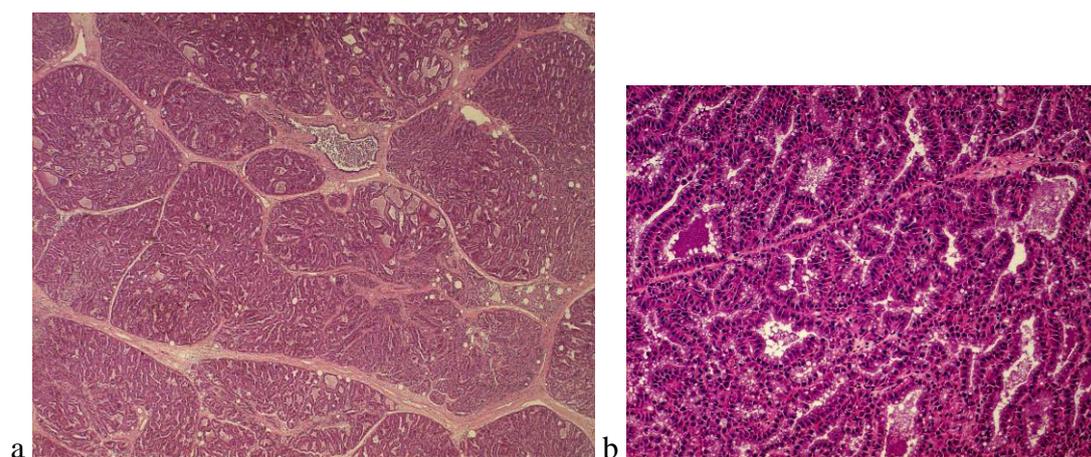
A mayores aumentos (25x), puede distinguirse el epitelio simple secretor que reviste la pared de los alveolos. Se trata de células epiteliales prismáticas, que presentan pequeñas vacuolas en el polo apical de su citoplasma. Los alvéolos están separados por tejido conectivo intralobulillar en el que, además de las células propias, aparecen de forma ocasional células linfoides.

En consecuencia, los resultados del estudio histológico de las glándulas mamarias perfundidas, consideradas viables según la valoración macroscópica y parámetros bioquímicos, no muestran diferencias con respecto a una glándula mamaria de una oveja recién sacrificada (figuras 39 y 40). Estos resultados coinciden con los encontrados previamente por Kietzmann *et al.* (1993) y Ehinger y Kietzmann (2000a y b).



**Figura 39.** a) Corte histológico de tejido mamario perfundido. H&E.3,87x.

b) Detalle de la imagen anterior. H&E.25x.



**Figura 40.** a) Corte histológico de tejido mamario no perfundido. H&E.3,87x.

b) Detalle de la imagen anterior. H&E.25x.

## 1.2. Administración sistémica de enrofloxacino

### 1.2.1. Solución Tyrode

En la tabla 17 se recogen los valores de las concentraciones de enrofloxacino en solución Tyrode, en los diferentes tiempos muestrales establecidos, con sus medias ( $\bar{x}$ ), desviaciones estándar (DE) y coeficientes de variación (CV) para cada una de las ovejas.

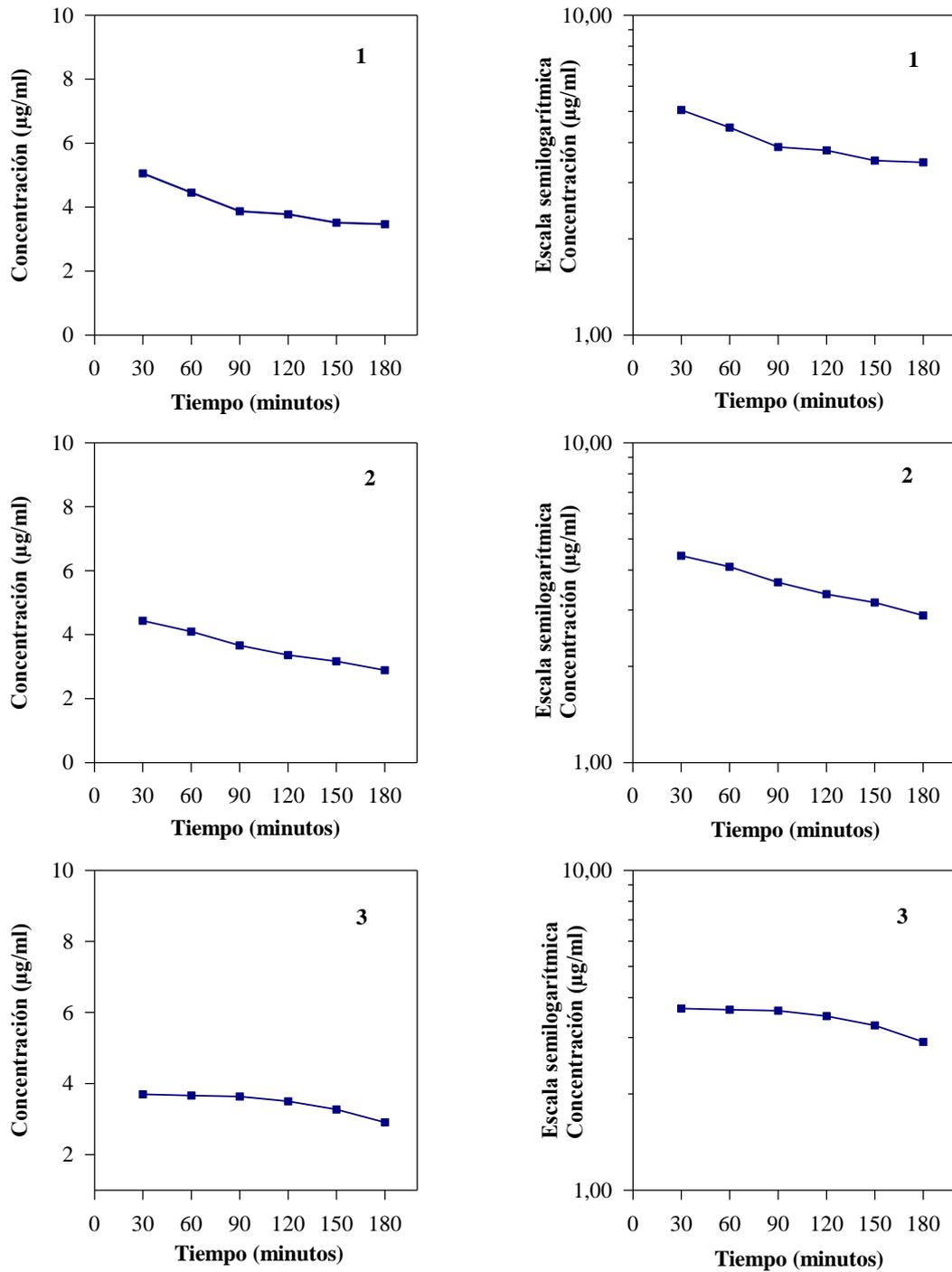
En las figuras 41 a 44 se observa la evolución de las concentraciones de enrofloxacino frente al tiempo, en escala normal y semilogarítmica en cada una de las ubres perfundidas.

Asimismo, en la figura 45 están representadas la media de las concentraciones experimentales con sus desviaciones estándar frente al tiempo, en escala normal y semilogarítmica.

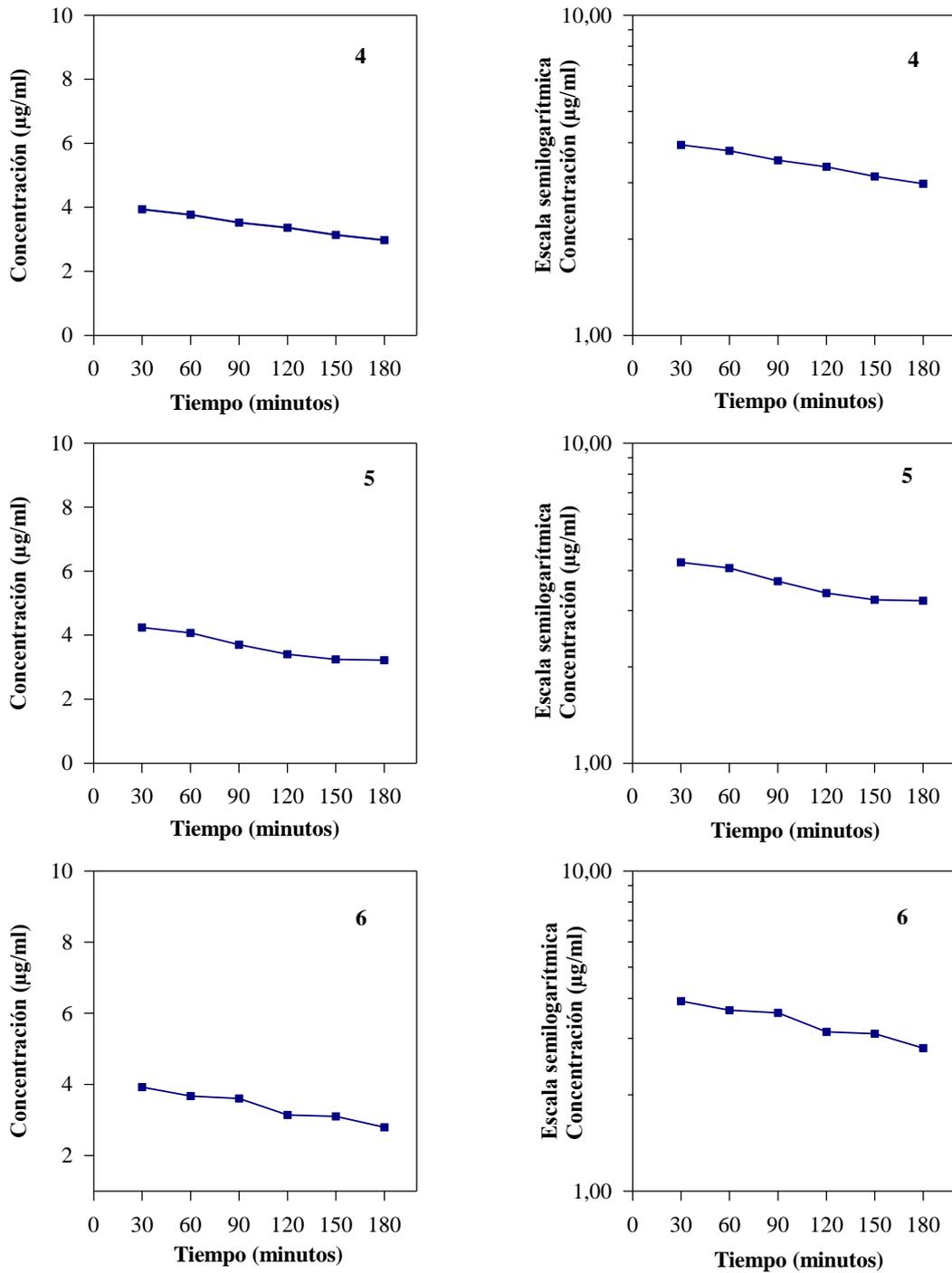
**Tabla 17.** Concentraciones de enrofloxacino ( $\mu\text{g/ml}$ ) en solución Tyrode obtenidas tras la administración *sistémica* de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida.

Nº oveja	Tiempo (minutos)						
	30	60	90	120	150	180	
1	4,655	4,457	3,872	3,778	3,512	3,465	
2	4,435	4,097	3,661	3,362	3,167	2,886	
3	3,698	3,661	3,637	3,450	3,273	2,907	
4	3,936	3,769	3,522	3,361	3,138	2,975	
5	4,241	4,072	3,700	3,400	3,240	3,217	
6	3,923	3,671	3,605	3,143	3,100	2,796	
7	3,933	3,917	3,765	3,644	3,343	3,217	
8	4,030	3,861	3,508	3,194	2,890	2,745	
9	3,938	3,744	3,720	3,337	3,232	3,121	
10	4,016	3,697	3,357	3,164	2,852	2,828	
11	3,618	3,541	3,272	2,786	2,751	2,656	
12	3,867	3,410	3,216	2,928	2,757	2,648	
	$\bar{x}$	4,024	3,825	3,570	3,296	3,105	2,955
	DE	0,293	0,282	0,202	0,277	0,242	0,253
	CV (%)	7,28	7,37	5,66	8,41	7,81	8,55

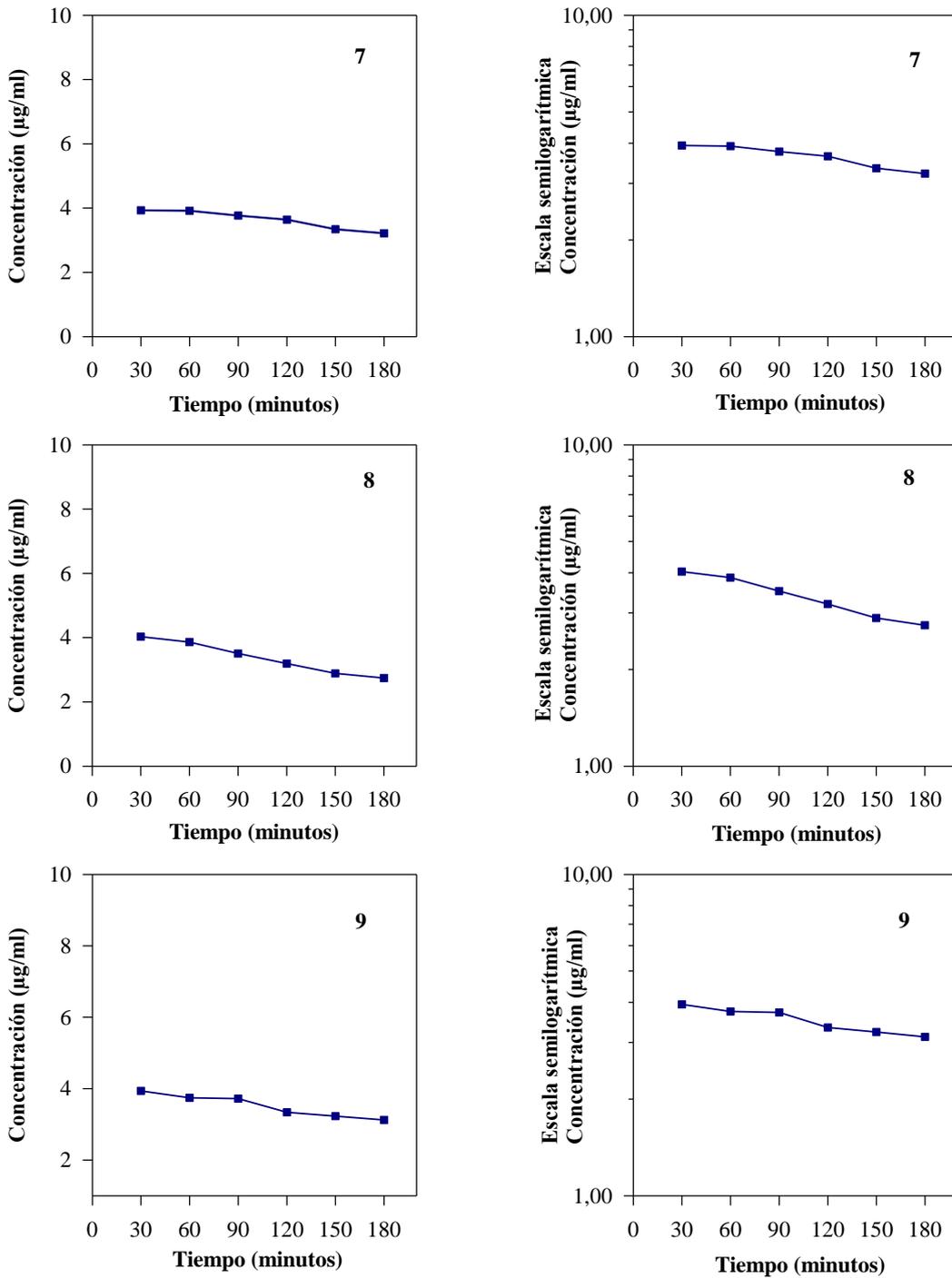
$\bar{x}$  = media, DE = desviación estándar, CV = coeficiente de variación.



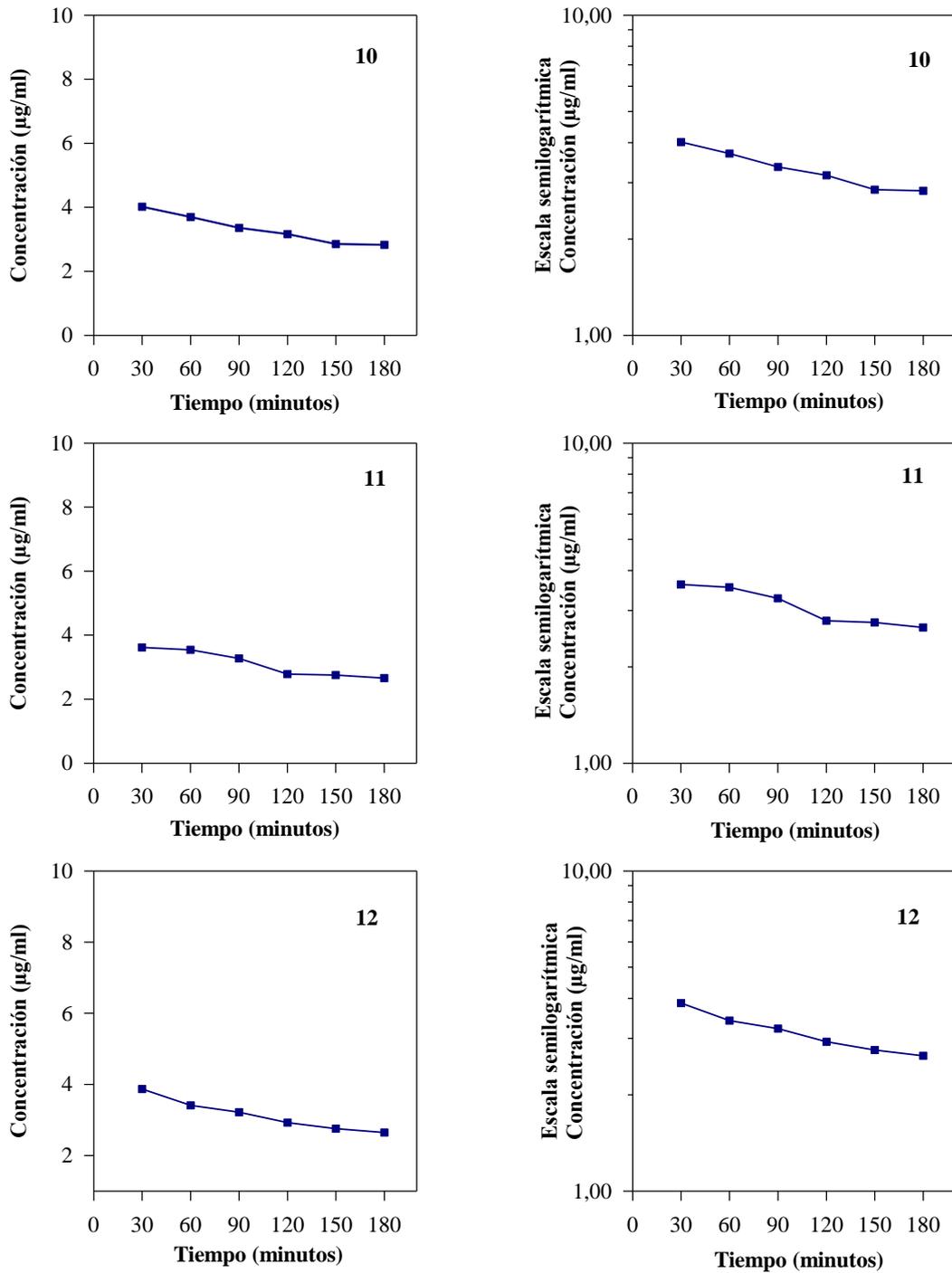
**Figura 41.** Curvas individuales de concentración de enrofloxacino en solución Tyrode tras la administración *sistémica* de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida. Ovejas 1 a 3.



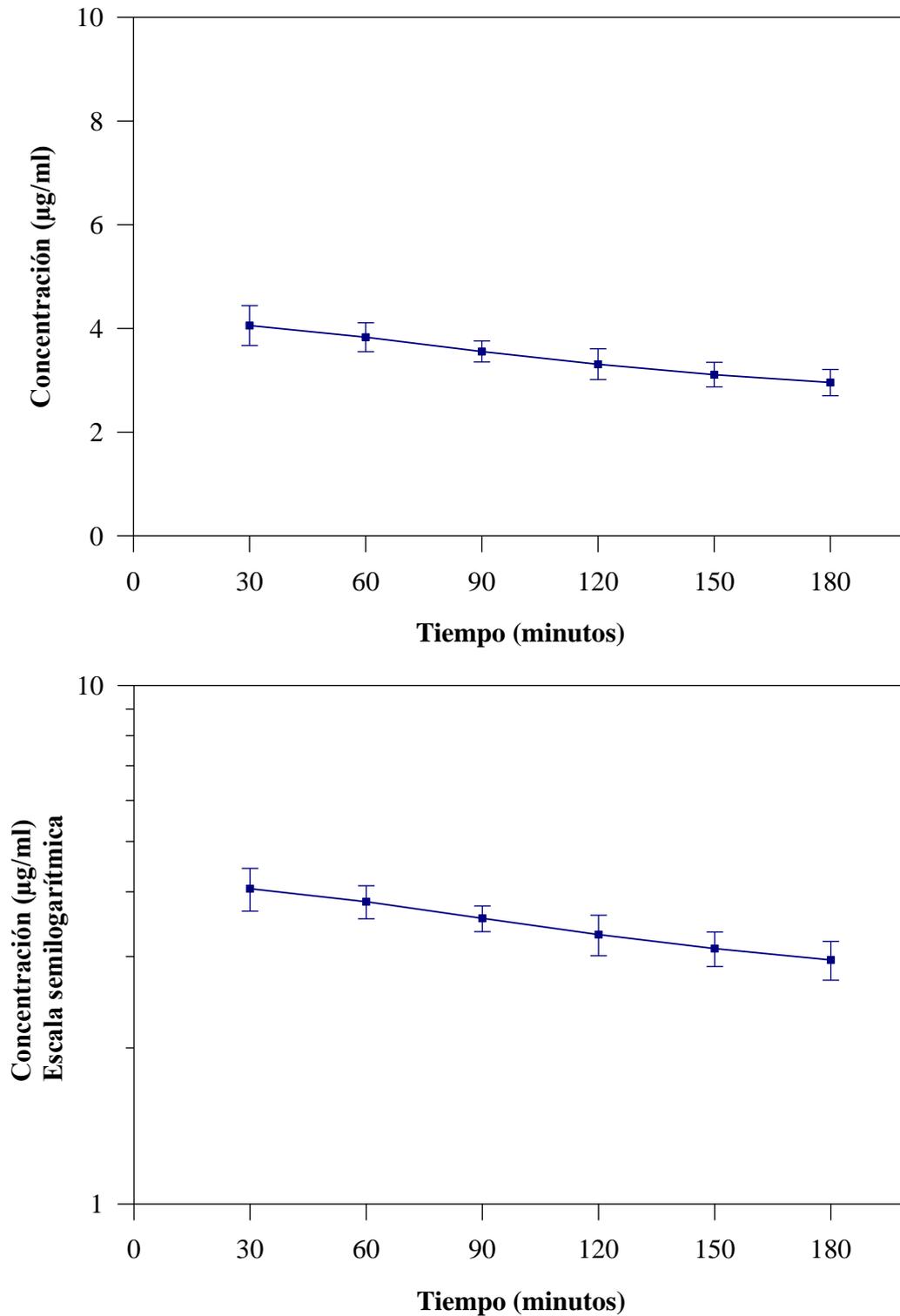
**Figura 42.** Curvas individuales de concentración de enrofloxacin en solución Tyrode tras la administración *sistémica* de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida. Ovejas 4 a 6.



**Figura 43.** Curvas individuales de concentración de enrofloxacin en solución Tyrode tras la administración *sistémica* de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida. Ovejas 7 a 9.



**Figura 44.** Curvas individuales de concentración de enrofloxacin en solución Tyrode tras la administración *sistémica* de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida. Ovejas 10 a 12.



**Figura 45.** Evolución de las concentraciones medias de enrofloxacin en solución Tyrode tras la administración *sistémica* de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida (n=12).

Los parámetros farmacocinéticos compartimentales y no compartimentales calculados con el programa WinNonlin<sup>®</sup> para el enrofloxacino, en solución Tyrode, tras la administración *sistémica* en el modelo *in vitro* aparecen recogidos en las tablas 18 y 19, en las que se incluyen los valores individuales para cada oveja junto con sus valores medios ( $\bar{x}$ ), desviaciones estándar (DE) y coeficientes de variación (CV). Tras el análisis estadístico llevado a cabo, no se observaron diferencias significativas entre los parámetros farmacocinéticos compartimentales y los no compartimentales:  $\lambda$ ,  $C_0$ ,  $AUC_{0-\infty}$ ,  $Cl$ ,  $V_{ss}$  (test  $t$ ,  $p \leq 0,05$ );  $t_{1/2\lambda}$ ,  $AUMC_{0-\infty}$ ,  $MRT$  (test Wilcoxon,  $p \leq 0,05$ ).

Tras la revisión bibliográfica llevada a cabo por nosotros, no se encontró ningún trabajo que hiciera referencia a la farmacocinética del enrofloxacino en el modelo *in vitro* de ubre ovina perfundida. Por ello, y a la hora de comparar los parámetros farmacocinéticos determinados por nosotros, se utilizaron los valores obtenidos por otros autores en estudios llevados a cabo *in vivo* en distintas especies animales y que aparecen reflejados, para la vía intravenosa, en la tabla 20 con el fin de facilitar, tanto la comparación como la discusión de los resultados obtenidos. Así mismo, en las tablas 21, 22 y 23 se han incluido los parámetros farmacocinéticos obtenidos por otros autores para otras vías de administración.

Los datos de concentración de enrofloxacino en solución Tyrode frente al tiempo obtenidos tras la administración *sistémica* muestran una cinética de eliminación de orden 1. Puede observarse que, tras el análisis no compartimental, los valores de  $\lambda$  oscilaron entre 0,00112 y 0,00299  $\text{min}^{-1}$ , resultando ligeramente inferiores a los datos obtenidos *in vivo* por Mengozzi *et al.* en 1996 en ovino, donde  $\lambda$  fue igual a 0,0035  $\text{min}^{-1}$ . Por su parte, tras realizar el análisis compartimental, se llegó a la conclusión de que el modelo que mejor definía la cinética del enrofloxacino tras la administración *sistémica* en el modelo *in vitro* de ubre ovina perfundida era el monocompartimental. En el caso de los estudios llevados a cabo *in vivo*, el modelo cinético elegido por la mayoría de los autores tras la administración intravenosa de enrofloxacino es el bicompartimental (Bregante *et al.*, 1999; Bermingham y Papich, 2002; Elsheikh *et al.*, 2002; Haritova *et al.*, 2003; Rahal *et al.*, 2006).

**Tabla 18.** Parámetros farmacocinéticos no compartimentales de enrofloxacinó tras la administración sistémica de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida.

N° oveja	Parámetros												
	$\lambda$ (min <sup>-1</sup> )	C <sub>0</sub> (µg/ml)	AUC <sub>0-4</sub> (µg·min/ml)	AUC <sub>0-∞</sub> (µg·min/ml)	Cl (ml/kg·min)	V <sub>a</sub> (ml/kg)	V <sub>ss</sub> (ml/kg)	t <sub>1/2z</sub> (min)	AUMC <sub>0-4</sub> (µg·min <sup>2</sup> /ml)	AUMC <sub>0-∞</sub> (µg·min <sup>2</sup> /ml)	MRT (min)	AUC <sub>0-4</sub> /AUC <sub>0-∞</sub> (%)	
1	0,00204	4,86	733,1	2434,1	2,05	1008,4	1014,9	340,3	61426,8	1202606,5	494,1	30,1	
2	0,00283	4,80	677,0	1696,5	2,95	1041,2	1040,8	244,9	55397,7	599070,0	353,1	39,9	
3	0,00248	3,74	631,2	1800,0	2,78	1116,8	1134,3	278,7	54735,3	735042,0	408,4	35,1	
4	0,00191	4,11	638,1	2197,5	2,28	1192,7	1193,0	363,3	54089,1	1152253,3	524,3	29,0	
5	0,00299	4,42	674,1	2283,2	2,19	1095,4	1104,1	346,7	56642,4	1151119,0	504,2	29,5	
6	0,00225	4,19	628,1	1869,0	2,68	1187,3	1183,4	307,6	52686,0	826784,2	442,4	33,6	
7	0,00173	3,95	665,6	2530,8	1,98	1145,5	1151,3	401,9	57603,6	1474791,5	582,7	26,3	
8	0,00275	4,21	628,8	1627,5	3,07	1117,8	1123,4	252,2	51963,3	595123,3	365,7	38,6	
9	0,00112	4,14	648,1	3443,6	1,45	1300,6	1291,3	620,9	55311,3	3062549,7	889,3	18,8	
10	0,00241	4,36	620,4	1792,2	2,79	1156,0	1163,8	287,2	51192,9	747629,0	417,2	34,6	
11	0,00230	3,70	574,3	1728,6	2,89	1257,1	1267,5	301,2	48044,7	757476,7	438,2	33,2	
12	0,00217	4,39	590,8	1812,0	2,76	1272,5	1266,0	319,6	48398,4	831331,6	458,8	32,6	
$\bar{x}$	0,00225	4,24	642,5	2101,2	2,49	1157,6	1161,2	338,7	53957,6	1094648,1	489,9	31,8	
DE	0,00052	0,36	41,9	521,4	0,49	89,8	86,4	99,8	3812,9	676551,4	141,9	5,65	
CV (%)	22,95	8,51	6,52	24,81	19,77	7,76	7,44	29,46	7,07	61,81	28,97	17,78	

$\bar{x}$  = media, DE = desviación estándar, CV = coeficiente de variación.

**Tabla 19.** Parámetros farmacocinéticos compartimentales de enrofloxacinó tras la administración sistémica de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida.

Nº oveja	$k_e$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$C_{\max}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$AUC_{0-\infty}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{min/ml}$ )	CI ( $\text{ml/kg}\cdot\text{min}$ )	$V_{ss}$ ( $\text{ml/kg}$ )	$t_{1/2ke}$ ( $\text{min}$ )	$AUMC_{0-\infty}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{min}^2/\text{ml}$ )	MRT ( $\text{min}$ )
1	0,00211	4,90	2320,0	2,16	1019,9	328,0	1097922,7	473,2
2	0,00286	4,81	1680,3	2,98	1039,3	242,1	586901,5	349,3
3	0,00152	4,01	2632,8	1,90	1246,0	454,8	1727383,1	656,1
4	0,00190	4,19	2205,4	2,27	1192,7	364,7	1160259,3	526,1
5	0,00206	4,49	2183,6	2,29	1112,6	336,8	1060966,2	485,9
6	0,00223	4,23	1897,9	2,63	1182,0	311,0	851506,8	448,7
7	0,00144	4,21	2929,3	1,71	1186,3	481,7	2035894,7	695,0
8	0,00274	4,45	1622,2	3,08	1123,4	252,6	591213,9	364,5
9	0,00163	4,16	2545,2	1,96	1203,3	424,6	1558924,9	612,5
10	0,00248	4,27	1722,0	2,90	1171,8	279,7	694955,1	403,6
11	0,00235	3,94	1672,7	2,99	1270,4	294,6	710906,8	425,0
12	0,00250	4,04	1614,8	3,10	1236,6	276,8	644893,9	399,4
$\bar{x}$	0,00215	4,31	2085,5	2,50	1165,4	337,3	1060144,1	486,6
DE	0,00046	0,30	451,3	0,51	78,1	79,1	483611,1	114,1
CV (%)	21,59	7,03	21,64	20,33	6,70	23,45	45,62	23,45

 $\bar{x}$  = media, DE = desviación estándar, CV = coeficiente de variación.

**Tabla 20.** Parámetros farmacocinéticos obtenidos por diversos autores tras la administración intravenosa de enrofloxacin en distintas especies animales.

Administración intravenosa	Parámetros farmacocinéticos													
	Modelo cinético	Dosis (mg/kg)	$\alpha$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$\beta$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$\gamma$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$\lambda$ ( $\text{min}^{-1}$ )	AUC <sub>0-∞</sub> (μg·h/ml)	V <sub>a</sub> (l/kg)	V <sub>ss</sub> (l/kg)	V <sub>c</sub> (l/kg)	V <sub>p</sub> (l/kg)	MRT (min)	t <sub>1/2</sub> (min)	CI (ml/kg·min)
<b>OVINO</b>														
Mengozi <i>et al.</i> (1996)	no-comp.	2,5	-	-	-	0,0035	5,47	2,18	3,02	-	-	321,60	223,80	9,17
Pozzin <i>et al.</i> (1997)	-	2,5	-	-	-	-	10,40	1,30	-	-	-	-	228,00	-
Bregante <i>et al.</i> (1999)	bicomp.	2,5	-	-	-	-	8,98	1,53	-	-	-	193,20	150,00	4,60
Otero <i>et al.</i> (2000)	-	-	-	-	-	-	-	1,07	-	-	-	-	141,60	6,00
Bermingham y Papich (2002)	bicomp.	5	0,0092	0,0022	-	-	31,19	1,15	0,97	-	-	300,00	286,20	3,37
Elsheikh <i>et al.</i> (2002)	bicomp.	5	0,0550	0,0036	-	-	9,42	2,50	2,27	0,76	-	-	195,59	8,86
Hariotva <i>et al.</i> (2003) <sup>a</sup>	bicomp.	2,5	0,1500	0,0037	-	-	4,19	2,91	2,82	1,35	1,43	288,60	198,00	10,05
Rahal <i>et al.</i> (2006)	bicomp.	5	-	-	-	-	-	2,97	2,70	1,38	1,33	205,80	156,00	14,30
Otero <i>et al.</i> (2009)	no-comp.	2,5	-	-	-	-	9,24	-	-	-	-	181,20	127,20	-
Otero <i>et al.</i> (2009)	tricomp.	2,5	0,1960	0,0161	0,0027	-	-	-	1,10	0,29	-	-	-	4,83
<b>CAPRINO</b>														
Kaartinen <i>et al.</i> (1995)	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100,80	-
Rao <i>et al.</i> (2000)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	90,00	-	13,50
Elmas <i>et al.</i> (2001)	bicomp.	5	-	-	-	-	21,12	-	1,22	-	-	247,80	240,00	4,00
Elsheikh <i>et al.</i> (2002)	bicomp.	5	0,0038	0,0045	-	-	7,72	2,21	1,94	1,13	-	-	163,76	11,72
Rao <i>et al.</i> (2002b)	bicomp.	2,5	0,1700	0,0161	-	-	1,92	1,38	1,27	0,77	-	58,26	43,80	22,20
El-Sooud (2003)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	163,80	-	27,83
Mohammed (2005)	bicomp.	5	0,0245	0,0026	-	-	2,23	3,80	3,10	1,50	-	324,00	282,00	-
Ambros <i>et al.</i> (2007)	bicomp.	7,5	-	-	-	-	13,49	0,77	-	-	-	-	79,80	-

<sup>a</sup> = animales en lactación, - = dato desconocido.

**Tabla 20 (continuación).** Parámetros farmacocinéticos obtenidos por diversos autores tras la administración intravenosa de enrofloxacin en distintas especies animales.

Administración intravenosa	Parámetros farmacocinéticos												
	Modelo cinético	Dosis (mg/kg)	$\alpha$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$\beta$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$\lambda$ ( $\text{min}^{-1}$ )	AUC <sub>0-∞</sub> ( $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ )	V <sub>a</sub> (l/kg)	V <sub>ss</sub> (l/kg)	V <sub>c</sub> (l/kg)	V <sub>p</sub> (l/kg)	MRT (min)	t <sub>1/2</sub> (min)	CI (ml/kg·min)
<b>BOVINO</b>													
Richez <i>et al.</i> (1994b)	-	5	-	-	-	10,08	1,65	-	-	-	-	138,00	-
Richez <i>et al.</i> (1994b) <sup>b</sup>	-	5	-	-	-	7,99	1,98	-	-	-	-	132,00	-
Kaartinen <i>et al.</i> (1995) <sup>a</sup>	-	5	-	-	-	7,42	1,63	-	-	-	-	100,80	-
Malbe <i>et al.</i> (1996)	bicomp.	5	-	-	-	-	-	2,10	-	-	256,80	65,40	21,00
Kaartinen <i>et al.</i> (1997b) <sup>1b</sup>	-	2,5	-	-	-	13,94	1,70	-	-	-	-	396,60	6,50
Kaartinen <i>et al.</i> (1997b) <sup>2b</sup>	-	2,5	-	-	-	6,73	2,61	-	-	-	-	292,20	6,50
Bregante <i>et al.</i> (1999)	-	2,5	-	-	-	5,28	2,98	-	-	-	-	169,20	-
Varma <i>et al.</i> (2003)	bicomp.	5	-	0,0047	-	4,42	4,10	0,45	2,12	-	208,80	156,60	19,06
<b>BUFALO</b>													
Kumar <i>et al.</i> (2003) <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	183,00	-	-
Sharma <i>et al.</i> (2003) <sup>b</sup>	bicomp.	5	0,1100	0,0040	-	3,10	7,38	-	-	-	233,54	172,20	27,80
<b>CONEJOS</b>													
Broome <i>et al.</i> (1991)	bicomp.	5	-	-	-	8,60	2,12	-	-	-	-	150,00	10,00
Cabanes <i>et al.</i> (1992)	-	5	-	-	-	3,89	4,40	-	-	-	-	130,80	-
Aramayona <i>et al.</i> (1996)	bicomp.	7,5	0,0226	0,0062	-	5,38	3,97	1,53	-	-	-	112,20	23,90
Bregante <i>et al.</i> (1999)	-	7,5	-	-	-	3,89	4,40	-	-	-	-	130,80	-
Elmas <i>et al.</i> (2007)	bicomp.	5	-	-	-	3,20	-	4,80	-	-	-	180,00	28,30

<sup>a</sup> = animales en lactación, <sup>b</sup> = terneros, <sup>1b</sup> = terneros de 1 día, <sup>2b</sup> = terneros de 1 semana, - = dato desconocido.

**Tabla 20 (continuación).** Parámetros farmacocinéticos obtenidos por diversos autores tras la administración intravenosa de enrofloxacin en distintas especies animales.

Administración intravenosa	Parámetros farmacocinéticos												
	Modelo cinético	Dosis (mg/kg)	$\alpha$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$\beta$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$\lambda$ ( $\text{min}^{-1}$ )	AUC <sub>0-<math>\infty</math></sub> ( $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ )	V <sub>a</sub> (l/kg)	V <sub>ss</sub> (l/kg)	V <sub>c</sub> (l/kg)	V <sub>p</sub> (l/kg)	MRT (min)	t <sub>1/2</sub> (min)	CI (ml/kg·min)
<b>ÉQUIDOS</b>													
Zehl <i>et al.</i> (1989)	-	5	-	-	-	23,24	-	-	-	-	-	389,40	-
Ensink <i>et al.</i> (1993)	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	330,00	-
Greene y Budsberg (1993)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	198,00	-
Pyörälä <i>et al.</i> (1994)	-	5	-	-	-	13,20	2,40	-	-	-	-	264,00	-
Gignéré <i>et al.</i> (1996)	-	5	-	-	-	58,30	0,78	-	-	-	-	365,40	-
Kaartinen <i>et al.</i> (1997a)	-	5	-	-	-	19,50	-	-	-	-	-	-	-
Bermingham <i>et al.</i> (2000)	-	5	-	-	-	48,54	2,31	-	-	-	-	990,00	-
Haines <i>et al.</i> (2002)	no-comp.	7,5	-	-	0,0022	21,03	2,93	-	-	-	393,00	319,80	6,16
<b>AVES</b>													
Greene y Budsberg (1993)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	438,00	-
Anadón <i>et al.</i> (1995)	-	10	-	-	-	34,50	4,30	-	-	-	579,00	617,40	4,80
Bugyei <i>et al.</i> (1999)	bicomp.	5	0,0306	0,0010	-	21,70	3,82	2,20	-	-	750,00	657,60	4,18
García Ovando <i>et al.</i> (1999)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	614,40	419,40	-
Knoll <i>et al.</i> (1999)	-	10	-	-	-	16,17	5,00	-	-	-	-	336,00	-
Soliman (2000)	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	403,20	285,00	-
Dimitrova <i>et al.</i> (2007)	no-comp.	10	-	-	-	25,91	-	-	-	-	537,60	398,40	6,80

- = dato desconocido.

**Tabla 20 (continuación).** Parámetros farmacocinéticos obtenidos por diversos autores tras la administración intravenosa de enrofloxacin en distintas especies animales.

		Parámetros farmacocinéticos											
Administración intravenosa	Modelo cinético	Dosis (mg/kg)	$\alpha$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$\beta$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$\lambda$ ( $\text{min}^{-1}$ )	AUC <sub>0-∞</sub> ( $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ )	V <sub>a</sub> (l/kg)	V <sub>ss</sub> (l/kg)	V <sub>c</sub> (l/kg)	V <sub>p</sub> (l/kg)	MRT (min)	t <sub>1/2</sub> (min)	CI (ml/kg·min)
<b>CERDOS</b>													
	Scheer (1987)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	360,00	-
	Richez <i>et al.</i> (1994a)	2,5	-	-	-	5,03	-	-	-	-	-	330,00	-
	Pijers <i>et al.</i> (1997)	2,5	-	-	-	9,94	3,50	2,66	-	-	585,00	463,80	-
	Zeng y Fung (1997)	2,5	-	-	-	5,97	3,34	-	-	-	-	343,00	-
	Anadón <i>et al.</i> (1999)	-	-	-	-	-	-	1,26	-	-	766,20	578,40	-
<b>GATO</b>													
	Richez <i>et al.</i> (1997b)	5	-	-	-	7,20	6,30	4,00	-	-	516,00	402,00	-
<b>PERRO</b>													
	Walker <i>et al.</i> (1992)	5,5	-	-	-	16,30	-	-	-	-	-	222,00	-
	Greene y Budsberg (1993)	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	126,00	-
	Kiing <i>et al.</i> (1993)	5	-	-	-	3,90	4,50	7,00	-	-	-	144,00	-
	Intorre <i>et al.</i> (1995)	5	-	-	-	4,34	5-5,6	-	-	-	-	162-180	-
	Cester <i>et al.</i> (1996)	5	-	-	-	7,27	2,50	2,35	-	-	-	151,20	-
	Stegemann <i>et al.</i> (1996)	5	-	-	-	8,15	4,20	-	-	-	-	288,00	-
	Monlouis <i>et al.</i> (1997)	5	-	-	-	8,20	4,50	3,70	-	-	324,00	264,00	-

.- = dato desconocido.

**Tabla 20 (continuación).** Parámetros farmacocinéticos obtenidos por diversos autores tras la administración intravenosa de enrofloxacin en distintas especies animales.

Administración intravenosa	Modelo cinético	Dosis (mg/kg)	Parámetros farmacocinéticos										
			$\alpha$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$\beta$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$\lambda$ ( $\text{min}^{-1}$ )	AUC <sub>0-∞</sub> ( $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ )	V <sub>a</sub> (l/kg)	V <sub>ss</sub> (l/kg)	V <sub>c</sub> (l/kg)	V <sub>p</sub> (l/kg)	MRT (min)	t <sub>1/2</sub> (min)	Cl (ml/kg.min)
<b>RATONES</b>													
Bregante <i>et al.</i> (1999)	-	10	-	-	-	2,45	10,50	-	-	-	-	88,80	-
<b>RATAS</b>													
Bregante <i>et al.</i> (1999)	-	7,5	-	-	-	5,65	4,78	-	-	-	-	108,00	-
<b>CAMELLOS</b>													
Gavrielli <i>et al.</i> (1995)	-	2,5	-	-	-	18,95	1,40	1,13	-	-	-	214,80	4,62
Harron <i>et al.</i> (1997) <sup>d</sup>	-	-	-	-	-	41,50	-	-	-	-	-	345,60	-
Harron <i>et al.</i> (1997) <sup>e</sup>	-	-	-	-	-	29,31	-	-	-	-	-	-	-
<b>PECES</b>													
Browser <i>et al.</i> (1992) <sup>c</sup>	-	10	-	-	-	109,20	3,22	-	-	-	-	1440-1800	-
Lewbart <i>et al.</i> (1997)	-	10	-	-	-	171,30	2,56	-	-	-	-	1740,00	-
<b>DELFINES</b>													
Linnehan <i>et al.</i> (1999)	-	5	-	-	-	15,40	-	-	-	-	-	384,00	-

<sup>c</sup> = trucha, <sup>d</sup> = animales jóvenes, <sup>e</sup> = animales maduros, - = dato desconocido.

Tabla 21. Parámetros farmacocinéticos obtenidos por diversos autores tras la administración intramuscular de enrofloxacin en distintas especies animales.

Administración intramuscular	Parámetros farmacocinéticos															
	Modelo cinético	Dosis (mg/kg)	F (%)	(C <sub>max</sub> ) (µg/ml)	(t <sub>max</sub> ) (min)	α (min <sup>-1</sup> )	β (min <sup>-1</sup> )	λ (min <sup>-1</sup> )	AUC <sub>0-∞</sub> (µg·h/ml)	V <sub>a</sub> (l/kg)	V <sub>ss</sub> (l/kg)	V <sub>c</sub> (l/kg)	V <sub>p</sub> (l/kg)	MRT (min)	t <sub>1/2</sub> (min)	CI (ml/kg·min)
<b>OVINO</b>																
Mengozzi <i>et al.</i> (1996)	no-comp.	2,5	85	0,78	75	-	-	0,0033	4,58	-	3,03	-	-	313,80	219,00	10,33
Elsheikh <i>et al.</i> (2002)	no-comp.	5	83	1,29	117,66	-	-	-	7,86	-	-	-	-	307,88	211,85	-
Haritova <i>et al.</i> (2003) <sup>a</sup>	no-comp.	2,5	75,35	0,74	49,80	-	-	-	3,11	-	-	-	-	271,20	232,20	-
<b>CAPRINO</b>																
Elmas <i>et al.</i> (2001)	bicomp.	2,5	90	3,25	65,40	-	-	-	19,07	-	1,51	-	-	345,00	282,00	4,30
Rao <i>et al.</i> (2001)	monocomp.	2,5	-	1,13	48	-	-	-	2,09	1,42	-	-	-	92,40	44,40	22,12
Elsheikh <i>et al.</i> (2002)	-	5	98	1,33	111,13	-	-	-	7,55	-	-	-	-	280,20	157,27	-
Rao <i>et al.</i> (2002)	monocomp.	5	-	2,8	52,80	-	-	-	7,82	1,52	-	-	-	142,20	83,40	13,38
Mohammed (2005)	bicomp.	5	100	0,33	44,40	0,0027	0,0983	-	2,29	-	-	-	-	-	264,60	-
Ambros <i>et al.</i> (2007)	monocomp.	7,5	100	2,12	76,20	-	-	-	11,18	-	-	-	-	-	158,40	-
<b>BOVINO</b>																
Kaartinen <i>et al.</i> (1995) <sup>a</sup>	-	5	82	0,73	144	-	-	-	-	-	-	-	-	478,80	354,00	-
García <i>et al.</i> (1996) <sup>b</sup>	-	-	-	1,66	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fu <i>et al.</i> (2008)	monocomp.	2,5	-	-	-	-	-	-	2,00	2,98	-	-	-	-	-	20,80
<b>BÚFALOS</b>																
Verma <i>et al.</i> (1999)	-	5	-	10,2	45	-	-	-	-	0,61	-	-	-	-	118,20	-
Sharma <i>et al.</i> (2003) <sup>b</sup>	monocomp.	5	-	0,49	51	-	-	-	3,80	10,63	-	-	-	378,50	337,70	22,25

<sup>a</sup> = animales en lactación, <sup>b</sup> = terneros, - = dato desconocido.

**Tabla 21 (continuación).** Parámetros farmacocinéticos obtenidos por diversos autores tras la administración intramuscular de enrofloxacin en distintas especies animales.

Administración intramuscular	Parámetros farmacocinéticos															
	Modelo cinético	Dosis (mg/kg)	F (%)	(C <sub>max</sub> ) (µg/ml)	(t <sub>max</sub> ) (min)	α (min <sup>-1</sup> )	β (min <sup>-1</sup> )	λ (min <sup>-1</sup> )	AUC <sub>0-∞</sub> (µg.h/ml)	V <sub>a</sub> (l/kg)	V <sub>ss</sub> (l/kg)	V <sub>c</sub> (l/kg)	V <sub>p</sub> (l/kg)	MRT (min)	t <sub>1/2</sub> (min)	CI (ml/kg.min)
<b>ÉQUIDOS</b>																
Pyörälä <i>et al.</i> (1994)	-	5	100	1,28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	594,00	-
<b>CERDOS</b>																
Richez <i>et al.</i> (1994a)	-	2,5	95	0,61	135	-	-	-	-	-	-	-	-	1149,60	787,20	-
Pipers <i>et al.</i> (1997)	-	2,5	101	0,75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	330,00	-
Zeng y Fung (1997)	-	2,5	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	243,60	-
Anadón <i>et al.</i> (1999)	-	2,5	-	-	-	-	-	-	-	1,85	-	-	-	-	723,60	1,60
<b>CONEJOS</b>																
Broome <i>et al.</i> (1991)	-	5	-	3,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	109,20	-
Cabanes <i>et al.</i> (1992)	-	5	92	3,04	10	-	-	-	-	-	2,90	-	-	-	109,20	21,70
Elmas <i>et al.</i> (2002)	bicomp.	5	-	1,40	38	-	-	-	5,40	-	3,00	-	-	192,00	180,00	15,00
Elmas <i>et al.</i> (2007)	bicomp.	5	90	1,90	25	-	-	-	2,70	-	-	-	-	-	144,00	-
<b>AVES</b>																
Bugyei <i>et al.</i> (1999)	bicomp.	5	98,60	2,10	47,40	0,0080	0,0012	-	21,40	3,79	2,82	-	-	750,00	636,00	4,16
<b>CAMELLOS</b>																
Gavrielli <i>et al.</i> (1995)	-	2,5	85	1,44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>PECES</b>																
Lewbart <i>et al.</i> (1997)	-	5	-	1,64	-	-	-	-	46,30	-	-	-	-	-	-	-

- = dato desconocido.

**Tabla 22.** Parámetros farmacocinéticos obtenidos por diversos autores tras la administración subcutánea de enrofloxacin en distintas especies animales.

Administración subcutánea	Modelo cinético	Dosis (mg/kg)	F (%)	$C_{max}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$t_{max}$ (min)	$\alpha$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$\beta$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$\lambda$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$AUC_{0-\infty}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ )	$V_a$ (l/kg)	$V_{ss}$ (l/kg)	$V_c$ (l/kg)	$V_p$ (l/kg)	MRT (min)	$t_{1/2}$ (min)	Cl (ml/kg·min)
<b>OVINO</b>																
Rahal <i>et al.</i> (2006)	monocomp.	5	50,62	0,66	120	-	-	-	8,78	2,97	-	-	-	673,80	427,20	-
<b>CAPRINO</b>																
Ramesh <i>et al.</i> (2002)	no-comp.	7,5	-	2,91	174	-	-	0,0042	19,35	-	-	-	-	344,40	170,40	-
<b>BOVINO</b>																
Richez <i>et al.</i> (1994b)	-	5	88	0,73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Richez <i>et al.</i> (1994b) <sup>b</sup>	-	2,8-5	97	0,87	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	132,00	-
Kaartinen <i>et al.</i> (1995) <sup>a</sup>	-	5	137	0,98	192	-	-	-	-	-	-	-	-	504,00	333,00	-
Martinez <i>et al.</i> y McKellar <i>et al.</i> (1997)	-	2,5	90	-	240	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
McKellar <i>et al.</i> (1999) <sup>b</sup>	-	2,5	-	0,24	105	-	-	-	1,39	-	-	-	-	331,30	-	-
TerHume <i>et al.</i> (2005) <sup>n</sup>	-	8	-	0,81	120	-	-	-	7,51	-	-	-	-	-	436,80	-
Davis <i>et al.</i> (2007) <sup>n</sup>	-	12,5	-	0,96	288	-	-	-	14,95	-	-	-	-	-	407,40	-
<b>GATO</b>																
Stegemann <i>et al.</i> (1997)	-	7,5	-	1,71	-	-	-	-	18,90	-	-	-	-	-	-	-
Lucais <i>et al.</i> (2008) <sup>f</sup>	no-comp.	2,5	0,60-0,73	75	-	-	-	0,0047-0,0052	3,19-3,34	-	-	-	-	238,2-262,8	140,4-155,4	-
<b>CONEJO</b>																
Broome <i>et al.</i> (1991)	monocomp.	5	77	-	34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	102,00	-

<sup>a</sup> = animales en lactación, <sup>b</sup> = terneros, <sup>n</sup> = novillos, <sup>f</sup> = formulación al 5 y 10%, - = dato desconocido.

**Tabla 23.** Parámetros farmacocinéticos obtenidos por diversos autores tras la administración oral de enrofloxacin en distintas especies animales.

Administración oral	Parámetros farmacocinéticos															
	Modelo cinético	Dosis (mg/kg)	F (%)	(C <sub>max</sub> ) (µg/ml)	(t <sub>max</sub> ) (min)	α (min <sup>-1</sup> )	β (min <sup>-1</sup> )	λ (min <sup>-1</sup> )	AUC <sub>0-∞</sub> (µg·h/ml)	V <sub>a</sub> (l/kg)	V <sub>ss</sub> (l/kg)	V <sub>c</sub> (l/kg)	V <sub>p</sub> (l/kg)	MRT (min)	t <sub>1/2</sub> (min)	Cl (ml/kg·min)
<b>OVINO</b>																
Pozzin <i>et al.</i> (1997)	-	2,5	61	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	228,00	-
Bermingham y Papich (2002)	monocomp.	5	47,89	1,61	330	-	-	-	30,58	-	-	-	-	1 168,20	-	-
<b>ÉQUIDOS</b>																
Zehl (1989)	-	5	-	-	-	-	-	-	18,94	-	-	-	-	-	-	-
Giguère <i>et al.</i> (1996)	-	5	62,50	5,44	-	-	-	-	35,62	-	-	-	-	-	306,00	-
Bermingham <i>et al.</i> (2000) p	-	5	42	2,20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	990,00	-
Haines <i>et al.</i> (2002)	-	7,5	78,30	1,85	45	-	-	-	16,30	7,71	7,28	-	-	868,80	637,20	8,16
<b>AVES</b>																
Anadón <i>et al.</i> (1995)	-	10	64	2,44	98,40	-	-	-	-	-	4,40	-	-	918	853,80	-
Abd-el Aziz <i>et al.</i> (1997)	-	10	59,60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	257,00	-
Bugyei <i>et al.</i> (1999)	-	5	80,10	0,99	150	-	-	-	17,40	-	2,52	-	-	822	-	3,00
Knoll <i>et al.</i> (1999)	-	10	89,20	1,88	-	-	-	-	-	-	-	-	-	456	348,00	-
Sumano (2003)	-	-	-	1,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dimitrova <i>et al.</i> (2007)	no-comp.	10	69,20	1,23	379,80	-	-	-	18,11	-	3,66	-	-	714,60	415,20	9,54

p = potros, - = dato desconocido.

**Tabla 23 (continuación).** Parámetros farmacocinéticos obtenidos por diversos autores tras la administración oral de enrofloxacin en distintas especies animales.

Administración oral	Modelo cinético	Dosis (mg/kg)	F (%)	$C_{max}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$t_{max}$ (min)	$\alpha$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$\beta$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$\lambda$ ( $\text{min}^{-1}$ )	Parámetros farmacocinéticos						
									$AUC_{0-\infty}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ )	$V_a$ (l/kg)	$V_{ss}$ (l/kg)	$V_c$ (l/kg)	$V_p$ (l/kg)	MRT (min)	$t_{1/2}$ (min)
<b>CONEJO</b>															
Broome <i>et al.</i> (1991)	bicomp.	5	61	0,45	138	-	-	-	-	-	-	-	507,60	144,60	-
<b>PERRO</b>															
Walker <i>et al.</i> (1992)	-	5,5	-	2,45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	240,00	-
Küng <i>et al.</i> (1993)	-	5	100	1,16	54	-	-	-	3,90	-	-	-	-	144,00	-
Cester <i>et al.</i> (1996)	-	5	72,30	1,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cester y Totain (1997)	-	5	-	1,12	111,60	-	-	-	5,34	-	-	-	-	133,80	-
Montouis <i>et al.</i> (1997)	-	5	83	1,44	108	-	-	-	-	2,60	-	-	270,00	162,00	-
Fraizer <i>et al.</i> (2000)	-	5	-	1,75	72,60	-	-	-	11,65	-	-	-	-	276,00	-
Heinen (2002)	no-comp.	5	-	1,41	109,80	-	-	-	-	-	-	-	396,00	246,00	-
Bidgood y Papich (2005)	no-comp.	5	63,22	1,24	56,40	-	-	0,0058	4,46	-	-	-	225,00	-	-
<b>GATO</b>															
Richez <i>et al.</i> (1997b)	-	5	100	1,66	36	-	-	-	-	3,10	-	-	522,00	372,00	-
<b>PECES</b>															
Lewbart <i>et al.</i> (1997) d	-	5	-	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stoffregen <i>et al.</i> (1997) e	-	10	46,00	0,29-0,54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

d = pacú, e = salmón, - = dato desconocido.

El valor medio de la constante de eliminación ( $k_e$ ) obtenida por nosotros fue  $0,00215 \text{ min}^{-1}$ . Si comparamos este valor con el obtenido por otros autores en ganado ovino pueden observarse ciertas similitudes. Así, en 2002, Bermingham y Papich obtuvieron un valor de  $k_e$  igual a  $0,0022 \text{ min}^{-1}$ , valor que coincide con el obtenido por nosotros tras la administración de la misma dosis. Por su parte, Elsheikh *et al.* (2002) y Haritova *et al.* (2003) señalan valores algo superiores,  $0,0036$  y  $0,0037 \text{ min}^{-1}$ , respectivamente.

La  $t_{1/2\lambda}$  se situó entre 244,9 y 620,9 min, resultando el valor medio de 338,7 min. Dicho valor resulta superior a los calculados en estudios *in vivo* por Mengozzi *et al.* en 1996 (223,8 min); Pozzin *et al.*, en 1997 (228,0 min) y Otero *et al.* en 2009 (127,2 min) tras llevar a cabo el análisis no compartimental. La  $t_{1/2k_e}$  (337,3 min) obtenida en nuestro estudio monocompartimental resulta asimismo superior a los valores medios señalados por el resto de autores en sus estudios bicompartimentales: Bregante *et al.*, 1999 (150 min); Otero *et al.*, 2000 (141,6 min); Bermingham y Papich, 2002 (286,2 min); Elsheikh *et al.*, 2002 (195,59 min); Haritova *et al.*, 2003 (198 min) y Rahal *et al.*, 2006 (156 min).

El hecho de que el valor de la constante de eliminación obtenido en nuestro modelo *in vitro* de ubre ovina perfundida sea inferior y que el valor de la vida media de eliminación sea mayor a la obtenida en los estudios *in vivo* podría deberse parcialmente a que el flujo sanguíneo real en el animal vivo fuese mayor al utilizado en el modelo *in vitro*, lo que favorecería una fase de eliminación del fármaco del organismo más rápida.

En el mismo sentido que la vida media de eliminación, el tiempo de residencia medio (MRT) calculado en el presente estudio (489,9 min) resulta superior al determinado por Mengozzi *et al.* (1996) (321,6 min) y Otero *et al.* (2009) (181,2 min) en animales vivos, tras el análisis no compartimental. El valor medio calculado para el modelo monocompartimental (486,6 min) resulta asimismo superior al obtenido por Bregante *et al.* (1999) (193,2 min); Bermingham y Papich (2002) (300 min); Haritova *et al.* (2003) (288,60 min) y Rahal *et al.* (2006) (205,80 min) en base a un modelo bicompartimental. Este hecho podría explicarse de

la misma forma a lo señalado en el párrafo anterior para la vida media y la constante de eliminación.

Por su parte, los volúmenes de distribución medios,  $V_a$  y  $V_{ss}$ , calculados en base al modelo no compartimental fueron 1157,6 y 1161,2 ml/kg (1,157 y 1,161 l/kg), respectivamente, siendo muy similar al valor determinado tras el análisis monocompartimental,  $V_{ss}$  1165,4 ml/kg (1,165 l/kg). Dichos valores resultan algo inferiores a los obtenidos por otros autores; Mengozzi *et al.*, 1996 ( $V_a = 2,18$  l/kg y  $V_{ss} = 3,02$  l/kg); Bregante *et al.*, 1999 ( $V_a = 1,53$  l/kg); Elsheikh *et al.*, 2002 ( $V_a = 2,50$  l/kg y  $V_{ss} = 2,27$  l/kg); Haritova *et al.*, 2003 ( $V_a = 2,91$  l/kg y  $V_{ss} = 2,82$  l/kg) y Rahal *et al.*, 2006 ( $V_a = 2,97$  l/kg y  $V_{ss} = 2,70$  l/kg), y similares a los determinados por Pozzin *et al.*, 1997 ( $V_a = 1,3$  l/kg); Otero *et al.*, 2000 ( $V_a = 1,07$  l/kg); Bermingham y Papich, 2002 ( $V_a = 1,15$  l/kg y  $V_{ss} = 0,97$  l/kg) y Otero *et al.*, 2009 ( $V_{ss} = 1,10$  l/kg), todos en la especie ovina. Señalar que los valores de  $V_a$  y  $V_{ss}$ , encontrados se corresponden, asimismo, con algunos de los valores obtenidos en otras especies animales. Así, se obtuvieron valores de  $V_{ss} = 1,22$  l/kg (Elmas *et al.*, 2001);  $V_a = 1,38$  l/kg y  $V_{ss} = 1,27$  l/kg (Rao *et al.*, 2002b) en caprino, de  $V_a = 1,65$  l/kg (Richez *et al.*, 1994b);  $V_a = 1,63$  l/kg (Kaartinen *et al.*, 1995) en bovino, de  $V_a = 0,78$  l/kg (Gigueré *et al.*, 1996) en équidos, de  $V_{ss} = 1,26$  l/kg (Anadón *et al.*, 1999) en cerdos, de  $V_a = 2,12$  l/kg (Broome *et al.*, 1991) en conejos y de  $V_a = 1,40$  l/kg y  $V_{ss} = 1,13$  l/kg (Gavrielli *et al.*, 1995) en camellos. Estos valores reflejan una buena distribución tisular del enrofloxacino, resultando superior a la de otros antibacterianos, tales como, los  $\beta$ -lactámicos y aminoglucósidos (Brown, 1996).

Con lo que respecta a el  $AUC_{0-t}$  y el  $AUC_{0-\infty}$ , pueden observarse valores comprendidos entre 574,3 y 733,1  $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$  (9,57 y 12,21  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ ) para el primer parámetro, y un valor medio de 2101  $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$  (35,02  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ ) para el segundo. El  $AUC_{0-t}$  obtenido es similar al publicado recientemente por Otero *et al.* (2009) (8,37  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ ) en ovejas vivas tras la administración intravenosa de una dosis de 2,5 mg/kg, resultando por su parte el  $AUC_{0-\infty}$  mayor al publicado por dicho autor (9,24  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ ).

Los valores de  $AUC_{0-\infty}$  determinados por otros autores; Mengozzi *et al.*, 1996 (5,47  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ ); Pozzin *et al.*, 1997 (10,40  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ ); Bregante *et al.*, 1999 (8,98  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ ); Elsheikh *et al.*, 2002 (9,42  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ ) y Haritova *et al.*, 2003 (4,19  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ ), resultan inferiores a los obtenidos por nosotros, excepto el valor publicado por Bermingham y Papich (2002) que es similar (31,19  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ ).

Finalmente, puede observarse que tras el análisis no compartimental, el aclaramiento, Cl, se situó en 2,49  $\text{ml}/\text{kg}\cdot\text{min}$ , resultando inferior al señalado por Mengozzi *et al.* (1996) (9,17  $\text{ml}/\text{kg}\cdot\text{min}$ ) tras la administración intravenosa de una dosis de 2,5  $\text{mg}/\text{kg}$ . Tras el análisis compartimental el valor medio obtenido fue de 2,50  $\text{ml}/\text{kg}\cdot\text{min}$ . Los estudios llevados a cabo en ovejas vivas (análisis bicompartimental) muestran valores de Cl superiores a los obtenidos por nosotros: 4,60  $\text{ml}/\text{kg}\cdot\text{min}$  (Bregante *et al.*, 1999); 3,4  $\text{ml}/\text{kg}\cdot\text{min}$  (Bermingham y Papich, 2002); 8,86  $\text{ml}/\text{kg}\cdot\text{min}$  (Elsheikh *et al.*, 2002); 10,05  $\text{ml}/\text{kg}\cdot\text{min}$  (Haritova *et al.*, 2003) y 14,30  $\text{ml}/\text{kg}\cdot\text{min}$  (Rahal *et al.*, 2006). Este parámetro es inferior en el modelo *in vitro* que *in vivo* por la misma razón que hemos señalado para la constante de eliminación.

### 1.2.2. Tejido mamario

En las tablas 24 y 25 pueden observarse las concentraciones de enrofloxacino obtenidas en el tejido mamario a las distintas alturas de muestreo, tanto en la glándula mamaria perfundida (tabla 24), como en la no perfundida (tabla 25), con sus medias ( $\bar{x}$ ), desviaciones estándar (DE) y coeficientes de variación (CV) para cada una de las ovejas.

En las figuras 46 y 47 se muestran las concentraciones de enrofloxacino frente a la altura de muestreo en la glándula perfundida, así como en la glándula contralateral no perfundida. De la misma manera, en la figura 48 está representada la media de las concentraciones con sus desviaciones estándar frente a la altura, para la glándula perfundida y no perfundida respectivamente.

**Tabla 24.** Concentraciones de enrofloxacino ( $\mu\text{g/g}$ ) en tejido mamario perfundido a las distintas alturas de muestreo obtenidas tras la administración *sistémica* de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida.

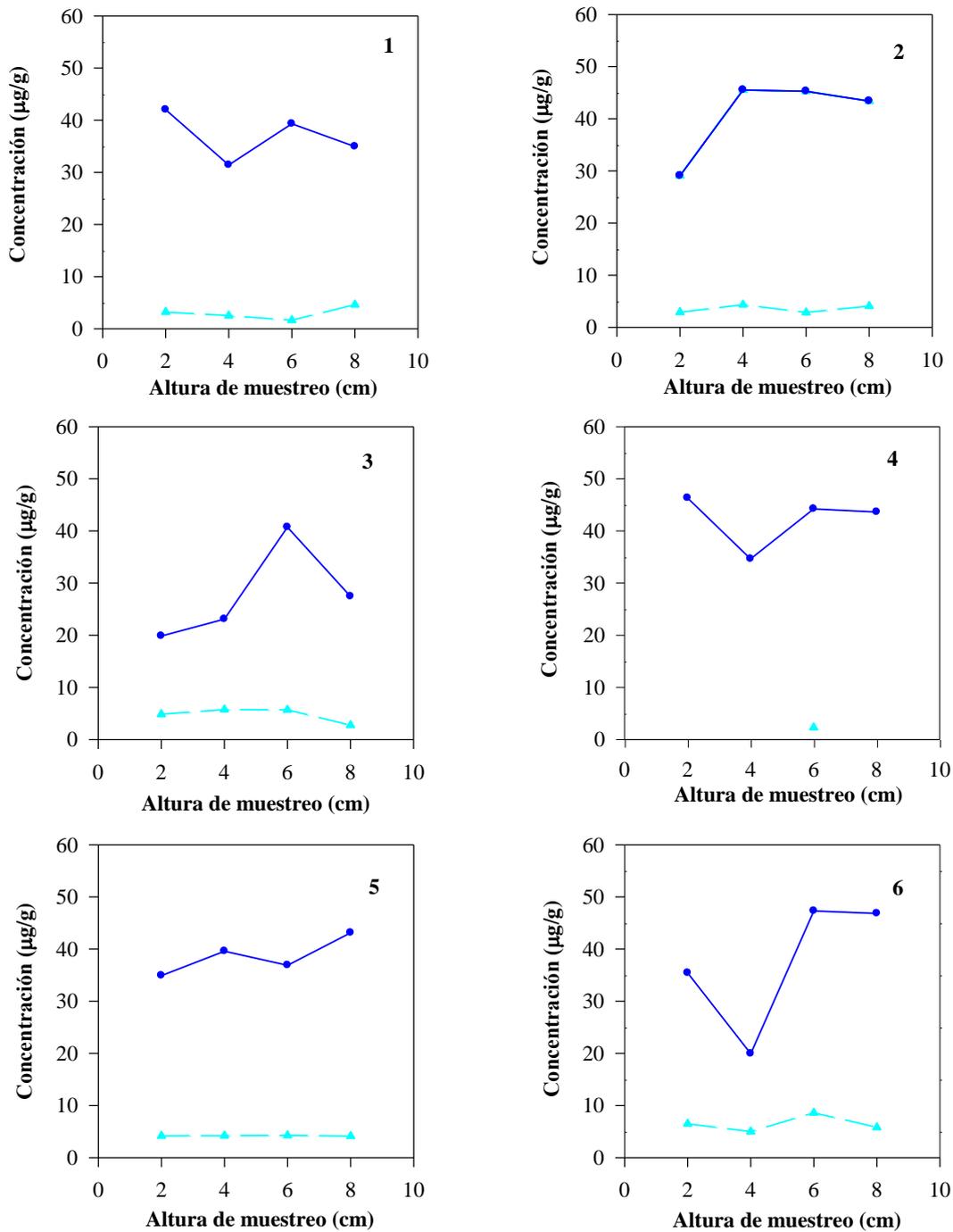
Nº oveja	Altura de muestreo (cm)				
	2	4	6	8	
1	42,02	31,41	39,30	34,94	
2	29,07	45,52	45,28	43,39	
3	19,86	23,08	40,71	27,44	
4	46,34	34,63	44,22	43,64	
5	34,91	39,57	36,90	43,12	
6	35,43	19,94	47,31	46,83	
7	39,07	51,86	53,92	45,40	
8	34,20	40,35	45,69	48,03	
9	31,41	36,51	43,38	36,28	
10	38,02	35,07	31,90	40,43	
11	37,94	43,54	20,65	34,90	
12	38,69	35,91	35,26	35,19	
	$\bar{x}$	35,58	36,45	40,38	39,97
	DE	6,74	8,93	8,57	6,19
	CV (%)	18,95	24,50	21,23	15,48

$\bar{x}$  = media, DE = desviación estándar, CV = coeficiente de variación.

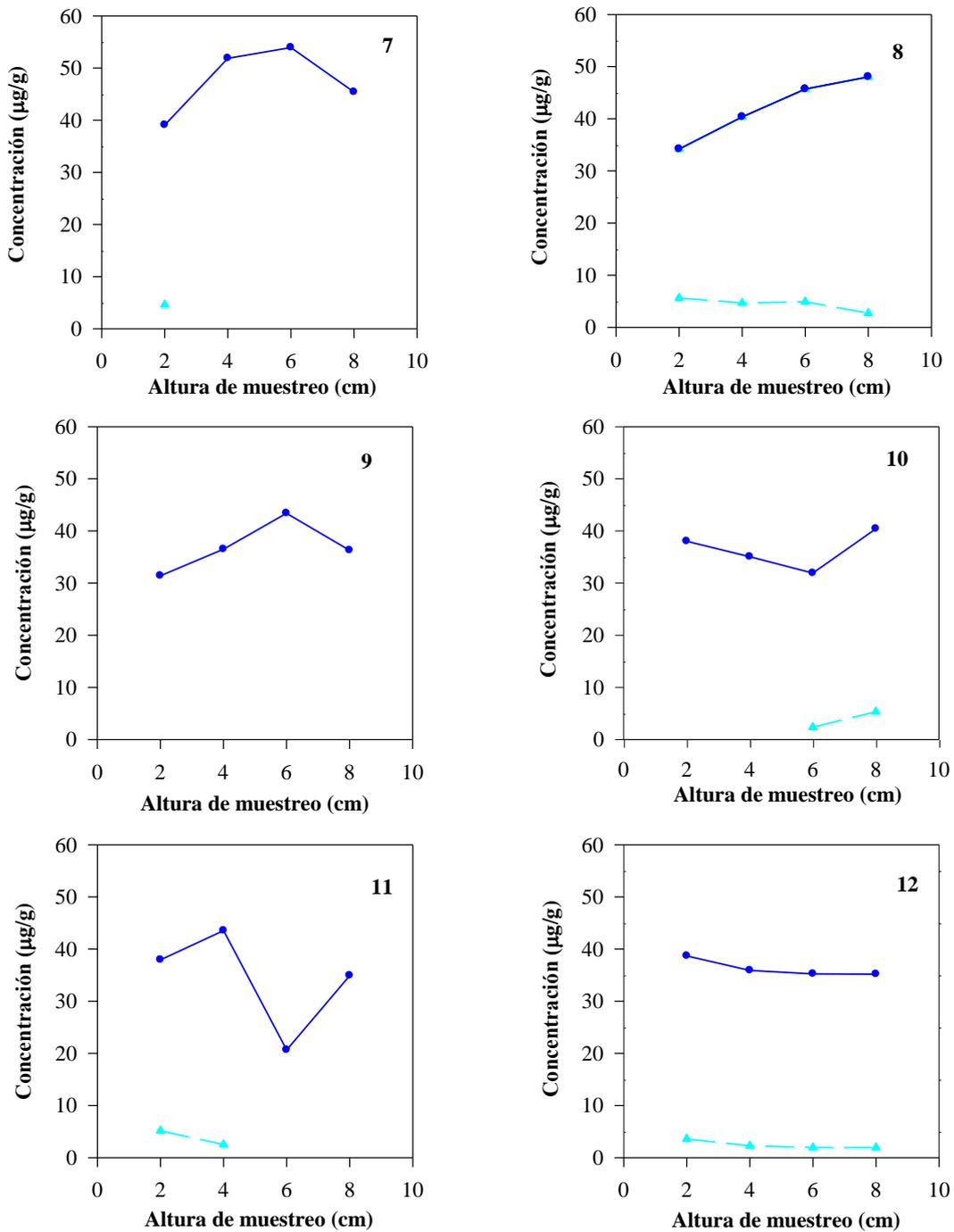
**Tabla 25.** Concentraciones de enrofloxacino ( $\mu\text{g/g}$ ) en tejido mamario contralateral no perfundido a las distintas alturas de muestreo obtenidas tras la administración *sistémica* de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida.

Nº oveja	Altura de muestreo (cm)				
	2	4	6	8	
1	3,178	2,489	1,628	4,604	
2	2,896	4,314	2,825	4,047	
3	4,842	5,731	5,691	2,753	
4	N.D.	N.D.	2,302	N.D.	
5	4,183	4,221	4,273	4,130	
6	6,476	4,982	8,589	5,791	
7	4,600	N.D.	N.D.	N.D.	
8	5,607	4,668	4,908	2,717	
9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
10	N.D.	N.D.	2,359	5,315	
11	5,123	2,489	N.D.	N.D.	
12	3,569	2,566	1,942	1,947	
	$\bar{x}$	4,50	3,93	3,84	3,91
	DE	1,17	1,26	2,27	1,35
	CV (%)	25,99	32,08	59,31	34,39

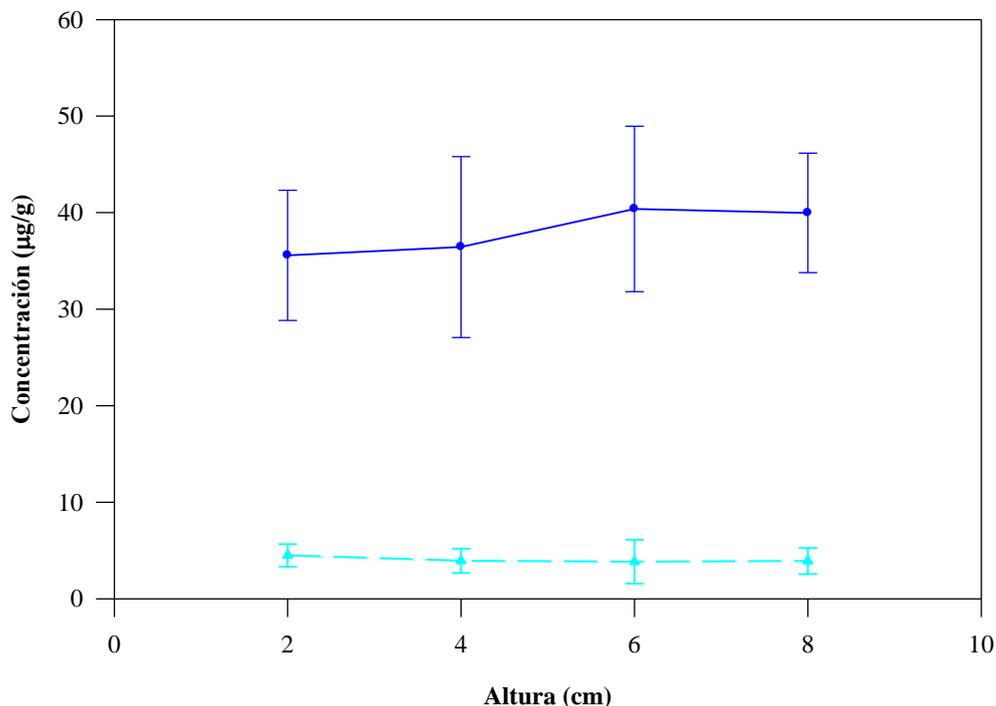
$\bar{x}$  = media, DE = desviación estándar, CV = coeficiente de variación, N.D. = no detectado.



**Figura 46.** Curvas individuales de concentración de enrofloxacino en tejido mamario perfundido (—●—) y en tejido mamario contralateral no perfundido (—▲—) a las distintas alturas de muestreo, tras la administración *sistémica* de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida. Ovejas 1 a 6.



**Figura 47.** Curvas individuales de concentración de enrofloxacino en tejido mamario perfundido (—●—) y en tejido mamario contralateral no perfundido (—▲—) a las distintas alturas de muestreo, tras la administración *sistémica* de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida. Ovejas 7 a 12.



**Figura 48.** Curva media de enrofloxacin en tejido mamario perfundido (—●—) y en tejido mamario contralateral no perfundido (—▲—) a las distintas alturas de muestreo, tras la administración *sistémica* de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida (n=12).

Con respecto al tejido mamario perfundido, y tal y como muestra la tabla 24, las concentraciones medias de enrofloxacin obtenidas a las distintas alturas de muestreo resultan muy similares entre sí, siendo de: 35,58 µg/g de tejido para las biopsias tomadas a 2 cm del pezón; 36,45 µg/g de tejido para los 4 cm; 40,38 µg/g de tejido para los 6 cm y 39,97 µg/g de tejido para los 8 cm de altura. El estudio estadístico realizado indicó que no había diferencias significativas entre estos valores (Anova de 2 vías,  $p \leq 0,05$ ). Aunque se observan valores ligeramente superiores a nivel de la base de la mama, es decir, a nivel de las biopsias realizadas a los 6 y 8 cm de altura a partir del pezón, se puede concluir diciendo que la distribución del enrofloxacin por la glándula mamaria perfundida tras su administración *sistémica*

en el modelo de ubre perfundida resulta uniforme. Este hecho fue ya observado con anterioridad por otros autores (Ehinger *et al.*, 2006; Kietzmann *et al.*, 2008).

En cuanto al tejido mamario contralateral no perfundido (tabla 25) los valores medios de enrofloxacino encontrados fueron de: 4,50  $\mu\text{g/g}$  de tejido; 3,93  $\mu\text{g/g}$  de tejido; 3,84  $\mu\text{g/g}$  de tejido y 3,91  $\mu\text{g/g}$  de tejido para las biopsias tomadas a los 2, 4, 6 y 8 cm de altura, respectivamente. Puede observarse, al igual que ocurre en la glándula mamaria perfundida, una distribución uniforme del enrofloxacino por todo el tejido glandular. Asimismo, y tras realizar el estudio estadístico correspondiente no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones medias de enrofloxacino y las distintas alturas de muestreo (Anova de 2 vías,  $p \leq 0,05$ ).

Finalmente señalar que, tras la administración *sistémica* de enrofloxacino en el modelo *in vitro* de ubre ovina perfundida, se observa que sólo hay un pequeño paso de enrofloxacino desde la glándula mamaria perfundida a la no perfundida, que da como resultado unas concentraciones 10 veces menores en el tejido no perfundido (figura 48). Tal y como se comentó en el apartado de revisión bibliográfica, este pequeño paso de enrofloxacino de la glándula perfundida a la no perfundida podría producirse a través de las arteriolas que emite la arteria mamaria media y que anastomosan con las arteriolas de la glándula contralateral. Otro factor que podría influir es la naturaleza lipídica del compuesto, produciéndose un pequeño paso de enrofloxacino por difusión a través del tejido graso.

El hecho de que la perfusión aislada de la glándula mamaria mediante el modelo de ubre perfundida da lugar a la aparición de una secreción láctea fue ya demostrado en trabajos anteriores llevados a cabo por distintos autores (Peeters y Massart, 1947; Hardwick y Linzell, 1960; Kietzmann *et al.*, 1993). Dicha secreción láctea fue denominada posteriormente por Zeitlin y Eshraghi (2002) como *pseudo-leche*, debido a que se forma sin la presencia de sangre y su constitución es relativamente diferente. Para excluir la posibilidad de que la aparición de dicha *pseudo-leche* fuera el resultado de una simple bajada pasiva de la secreción previamente acumulada, los autores anteriormente citados llevaron a cabo diversas

pruebas basadas en la detención y reanudación de la perfusión intravascular, observando los cambios que se producían a nivel de la producción de *pseudo-leche*. Los resultados obtenidos indicaron que la producción de *pseudo-leche* era claramente dependiente del flujo de perfusión y no era simplemente el resultado del drenaje no específico de la leche materna previamente formada y acumulada.

En el caso particular de la administración *sistémica* en nuestro modelo *in vitro* de ubre ovina perfundida, se procedió a la recogida de esta *pseudo-leche* tras el periodo de perfusión (180 min) para determinar en ella la presencia de posibles residuos de enrofloxacin. Los valores de la concentración de enrofloxacin en *pseudo-leche*, con su media ( $\bar{x}$ ), desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV) para cada una de las ovejas se reflejan en la tabla 26.

**Tabla 26.** Concentraciones de enrofloxacin ( $\mu\text{g/ml}$ ) en *pseudo-leche* obtenidas tras la administración *sistémica* de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida.

Nº oveja	Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )
1	0,727
2	1,212
3	1,293
4	0,515
5	0,577
6	0,518
7	0,407
8	1,251
9	1,189
10	1,320
11	0,904
12	0,891
	$\bar{x}$ 0,900
	DE 0,345
	CV (%) 38,28

$\bar{x}$  = media, DE = desviación estándar, CV = coeficiente de variación.

Como muestra la tabla 26 y como era de esperar, se detectaron residuos de enrofloxacinó en *pseudo-leche* tras un periodo de perfusión de 180 min. Las concentraciones encontradas oscilaron entre 0,407 y 1,320 µg/ml, resultando la media de 0,900 µg/ml, apreciándose una gran variabilidad individual.

Después de la administración *sistémica* de 5 mg/kg de enrofloxacinó, si comparamos las concentraciones medias del compuesto encontradas en solución Tyrode y en *pseudo-leche*, tras 180 min de perfusión podemos observar claras diferencias; 2,955 µg/ml de enrofloxacinó en solución Tyrode vs. 0,900 µg/ml de enrofloxacinó en *pseudo-leche*, concentraciones que son 3,28 veces superiores en solución Tyrode que en *pseudo-leche*. El enrofloxacinó es un ácido débil por lo que por un proceso de difusión pasiva, se concentraría en la solución Tyrode al ser su pH más básico que el de la *pseudo-leche* (7,8 y 7,2 respectivamente). Esto explica los mayores valores de concentración obtenidos en la solución Tyrode.

Sin embargo, estudios llevados a cabo en animales vivos (Haritova *et al.*, 2003) muestran valores de enrofloxacinó en leche, tras la administración intravenosa, similares a los valores plasmáticos e incluso superiores. Este hecho, probablemente está relacionado con la elevada liposolubilidad del enrofloxacinó, que se acumularía en la leche frente a la *pseudo-leche* por su contenido en grasa..

### 1.3. Administración intramamaria de enrofloxacino

#### 1.3.1. Solución Tyrode

Las concentraciones de enrofloxacino en solución Tyrode tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) para cada oveja, sus valores medios ( $\bar{x}$ ), las desviaciones estándar (DE) y los coeficientes de variación (CV) se encuentran recogidos en la tabla 27.

**Tabla 27.** Concentraciones de enrofloxacino ( $\mu\text{g/ml}$ ) en solución Tyrode obtenidas tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida.

Nº oveja	Tiempo (minutos)						
	30	60	90	120	150	180	
1	0,286	0,651	1,412	1,678	2,066	2,133	
2	0,102	0,202	0,259	0,348	0,431	0,516	
3	1,368	1,661	1,919	2,341	2,484	2,492	
4	0,013	0,018	0,033	0,056	0,081	0,079	
5	0,349	0,585	1,198	1,383	1,557	1,635	
6	0,083	0,146	0,198	0,241	0,291	0,238	
7	0,218	0,402	0,525	0,771	1,073	1,128	
8	0,224	0,495	0,611	0,756	1,088	1,188	
9	0,06	0,148	0,156	0,197	0,251	0,271	
10	0,243	0,45	0,643	0,661	1,094	0,746	
11	0,275	0,438	0,667	0,714	0,745	0,659	
12	0,023	0,036	0,060	0,065	0,071	0,053	
13	0,048	0,115	0,217	0,252	0,283	0,379	
14	0,319	0,446	0,473	0,648	1,142	0,583	
	$\bar{x}$	0,442	0,633	0,906	1,106	1,266	1,305
	DE	0,340	0,414	0,556	0,664	0,746	0,762
	CV (%)	76,85	65,38	61,39	60,03	58,96	58,35

$\bar{x}$  = media, DE = desviación estándar, CV = coeficiente de variación.

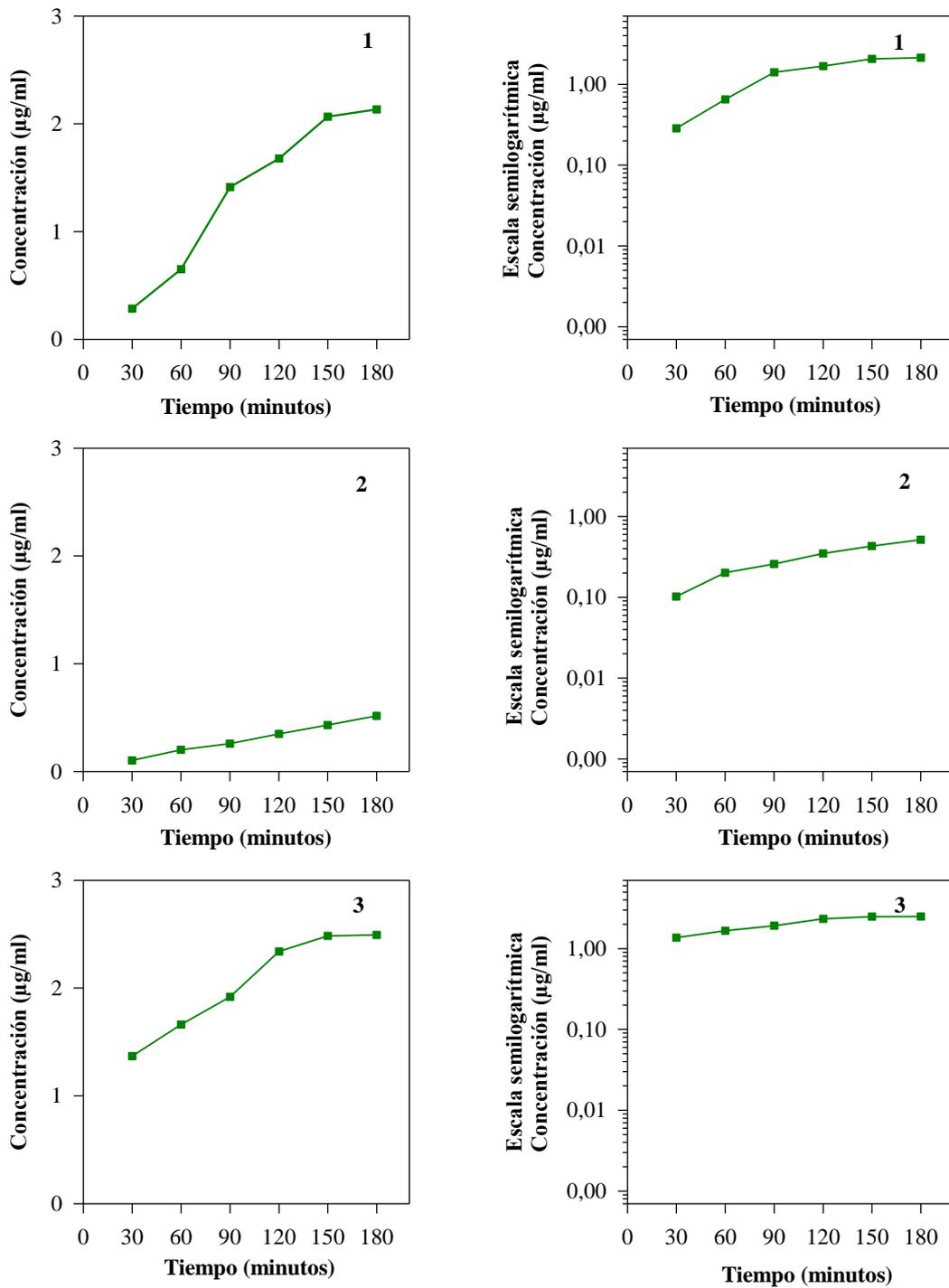
En las figuras 49 a 53 se representan las concentraciones de enrofloxacino frente al tiempo, en escala normal y semilogarítmica, obtenidas para cada oveja.

Como en el apartado anterior, en la figura 54 se muestra en escala normal y semilogarítmica la evolución de las concentraciones medias de enrofloxacino, con sus desviaciones estándar frente al tiempo.

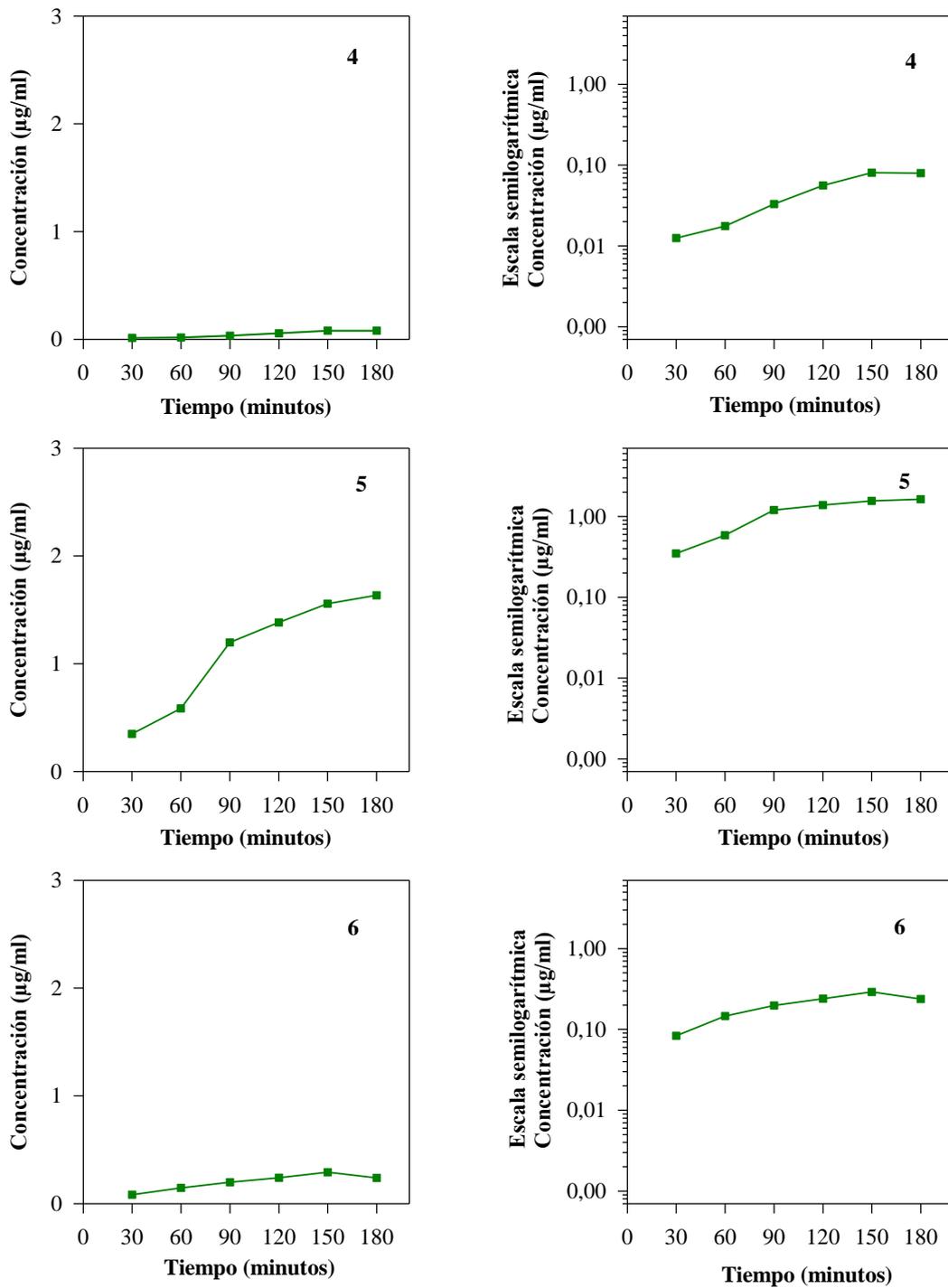
Tras la administración intramamaria de 5 g de pomada al 20% (m/m) de enrofloxacino en el modelo *in vitro* se observa el paso de antibacteriano a solución Tyrode. Las concentraciones medias detectadas a los distintos tiempos de muestreo, 30; 60; 90; 120; 150 y 180 min, fueron de 0,442; 0,633; 0,906; 1,106; 1,266 y 1,305 µg/ml, respectivamente. Puede observarse que la concentración media máxima de enrofloxacino se detectó en el último tiempo de muestreo, lo que indica que la concentración podría seguir aumentando, aunque más lentamente, de prolongarse el periodo de perfusión.

Si tenemos en cuenta las concentraciones individuales de enrofloxacino y no la media, se puede observar que en 6 de las 14 ubres perfundidas la concentración máxima de enrofloxacino se alcanza a los 150 min de la administración intramamaria, mientras que en el resto de las ubres perfundidas la concentración máxima se alcanza a los 180 min.

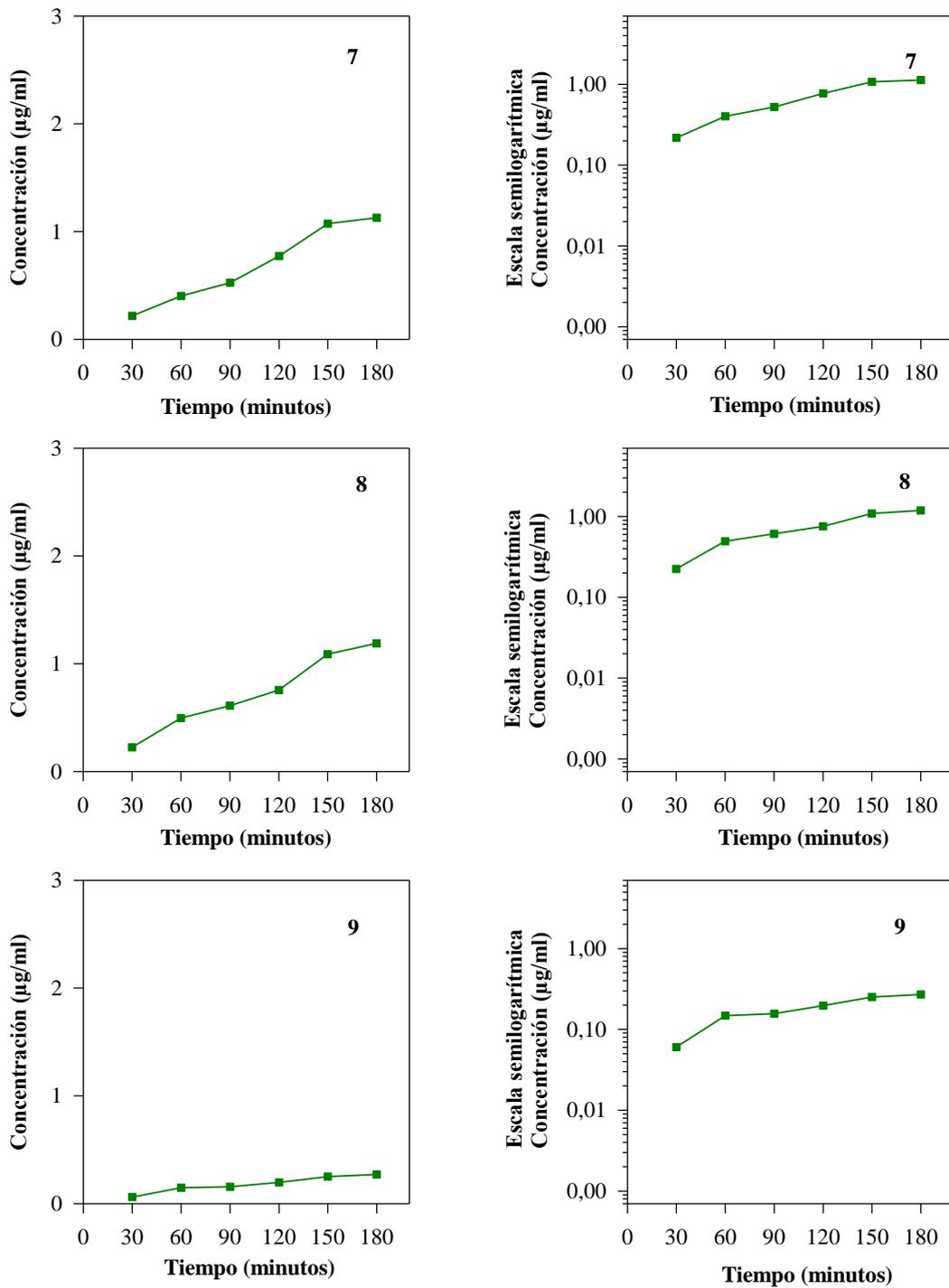
Por otra parte, podemos observar un elevado coeficiente de variación en cada punto de muestreo. Pensamos que estas diferencias son debidas a que, aunque todos los animales utilizados en el estudio se encontraban en lactación, no todos se encontraban en la misma fase, haciendo que los procesos de absorción y distribución del antibacteriano variasen de un animal a otro.



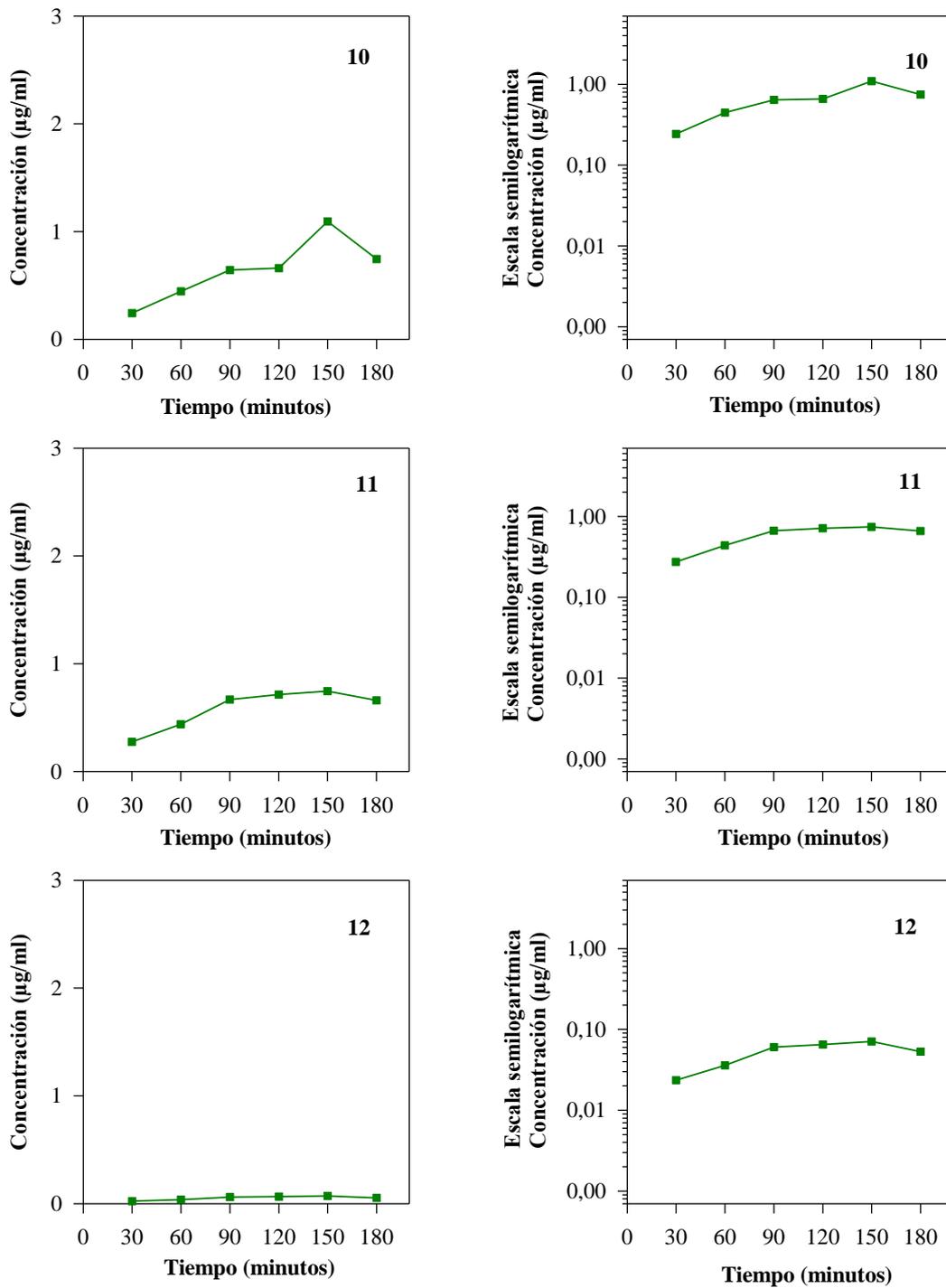
**Figura 49.** Curvas individuales de concentración de enrofloxacino en solución Tyrode tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida. Oveja 1 a 3.



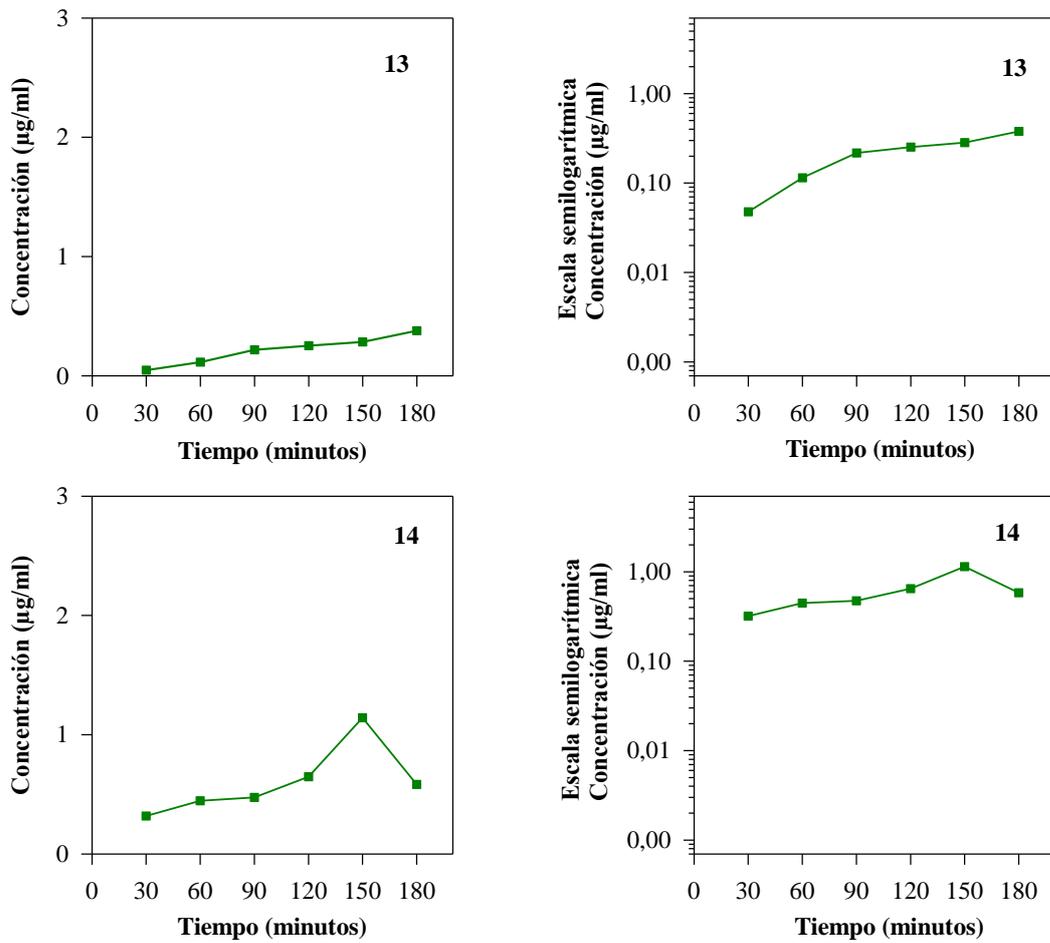
**Figura 50.** Curvas individuales de concentración de enrofloxacin en solución Tyrode tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacin (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida. Oveja 4 a 6.



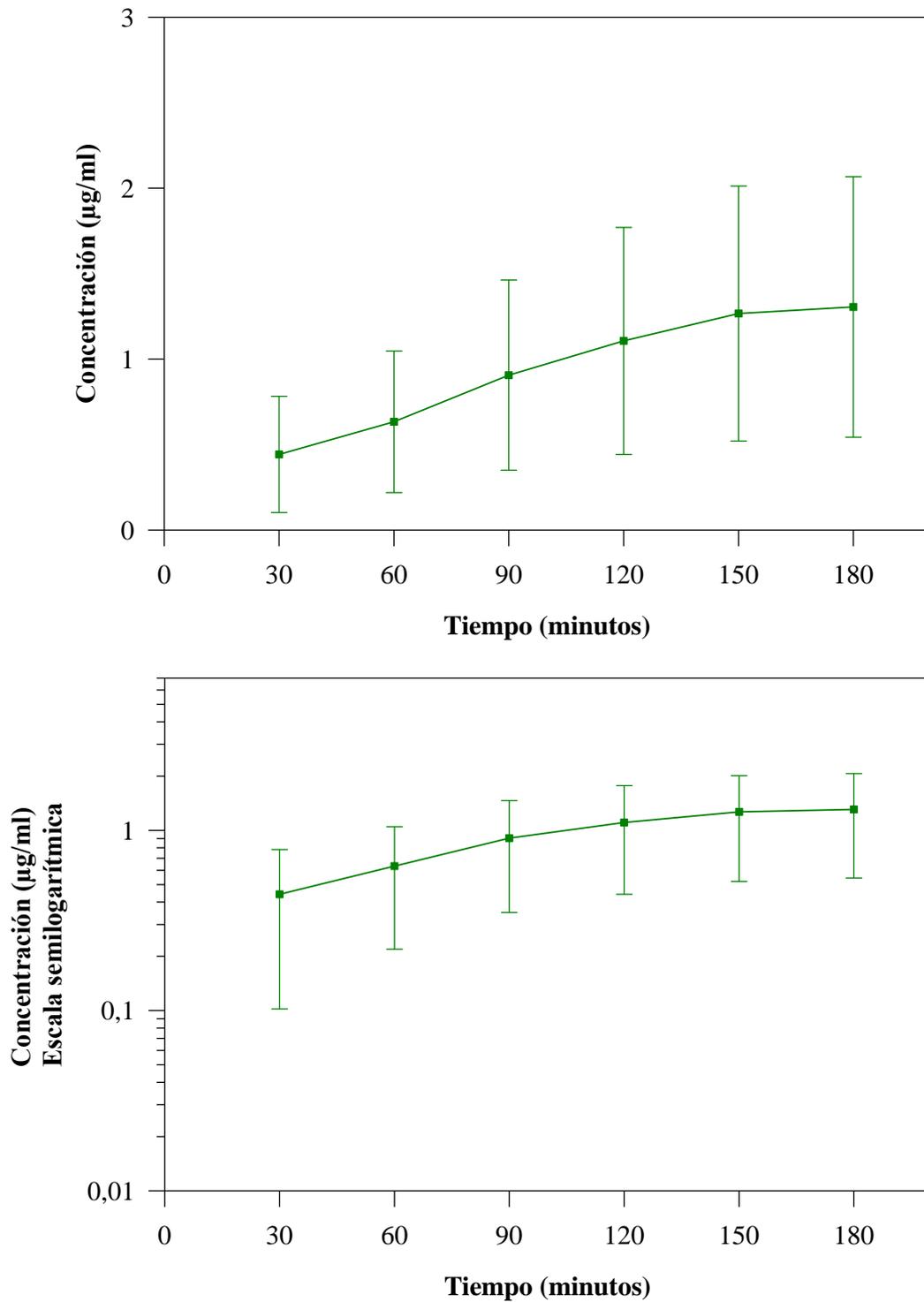
**Figura 51.** Curvas individuales de concentración de enrofloxacin en solución Tyrode tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacin (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida. Oveja 7 a 9.



**Figura 52.** Curvas individuales de concentración de enrofloxacino en solución Tyrode tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida. Oveja 10 a 12.

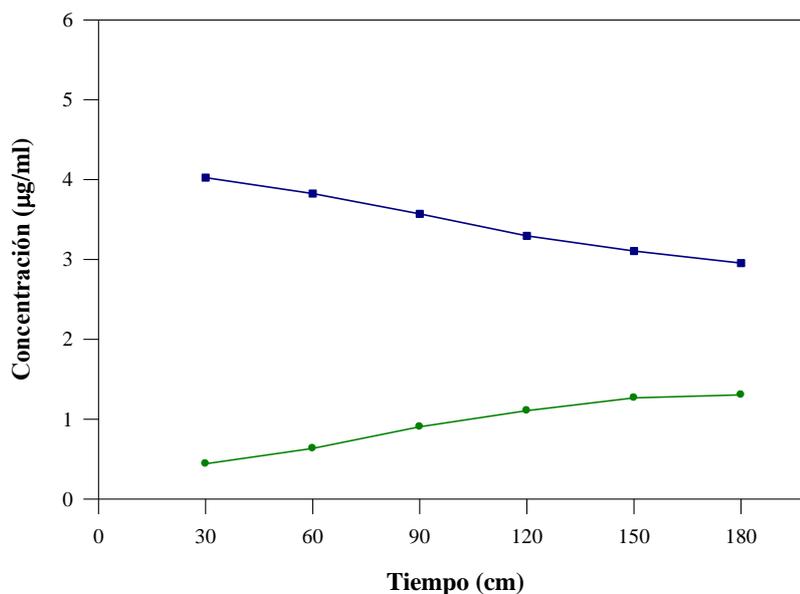


**Figura 53.** Curvas individuales de concentración de enrofloxacino en solución Tyrode tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida. Oveja 13 a 14.



**Figura 54.** Evolución de las concentraciones medias de enrofloxacino en solución Tyrode tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida (n=14).

En la figura 55 se representan conjuntamente las concentraciones medias de enrofloxacino frente al tiempo obtenidas tras la administración *sistémica* e intramamaria, y en ellas puede observarse que dichas concentraciones siempre son más bajas al utilizar la administración intramamaria.



**Figura 55.** Relación entre las concentraciones medias de enrofloxacino en solución Tyrode tras la administración sistémica de 5 mg/kg (—■—) y tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20 % (m/m)) (—●—) en el modelo de ubre perfundida (n = 12 y n = 14 respectivamente).

### 1.3.2. Tejido mamario

Las concentraciones de enrofloxacinó obtenidas al finalizar el tiempo de perfusión (180 min), a las distintas alturas de muestreo, tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacinó (5 g de pomada al 20% (m/m)), tanto en la glándula mamaria perfundida como en la no perfundida, con sus medias ( $\bar{x}$ ), desviaciones estándar (DE) y coeficientes de variación (CV) para cada una de las ovejas, pueden observarse en las tablas 28 y 29, respectivamente.

**Tabla 28.** Concentraciones de enrofloxacinó ( $\mu\text{g/g}$ ) en tejido mamario perfundido a las distintas alturas de muestreo obtenidas tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacinó (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida.

N° oveja	Altura de muestreo (cm)				
	2	4	6	8	
1	145,03	108,20	56,52	53,01	
2	48,57	16,47	13,68	11,12	
3	179,55	32,12	23,23	21,28	
4	122,05	61,12	53,43	20,28	
5	187,43	146,92	114,70	30,23	
6	116,79	42,51	25,79	19,66	
7	94,75	50,30	45,16	34,91	
8	19,64	17,33	16,66	13,76	
9	45,19	13,85	6,70	6,22	
10	197,30	23,59	16,29	13,10	
11	54,34	45,42	43,95	41,68	
12	89,48	29,82	17,10	13,99	
13	142,14	25,61	20,89	13,10	
14	10,92	9,56	7,95	6,56	
	$\bar{x}$	123,80	54,48	36,72	26,42
	DE	62,06	38,94	28,69	13,82
	CV (%)	50,13	71,47	78,14	52,30

$\bar{x}$  = media, DE = desviación estándar, CV = coeficiente de variación.

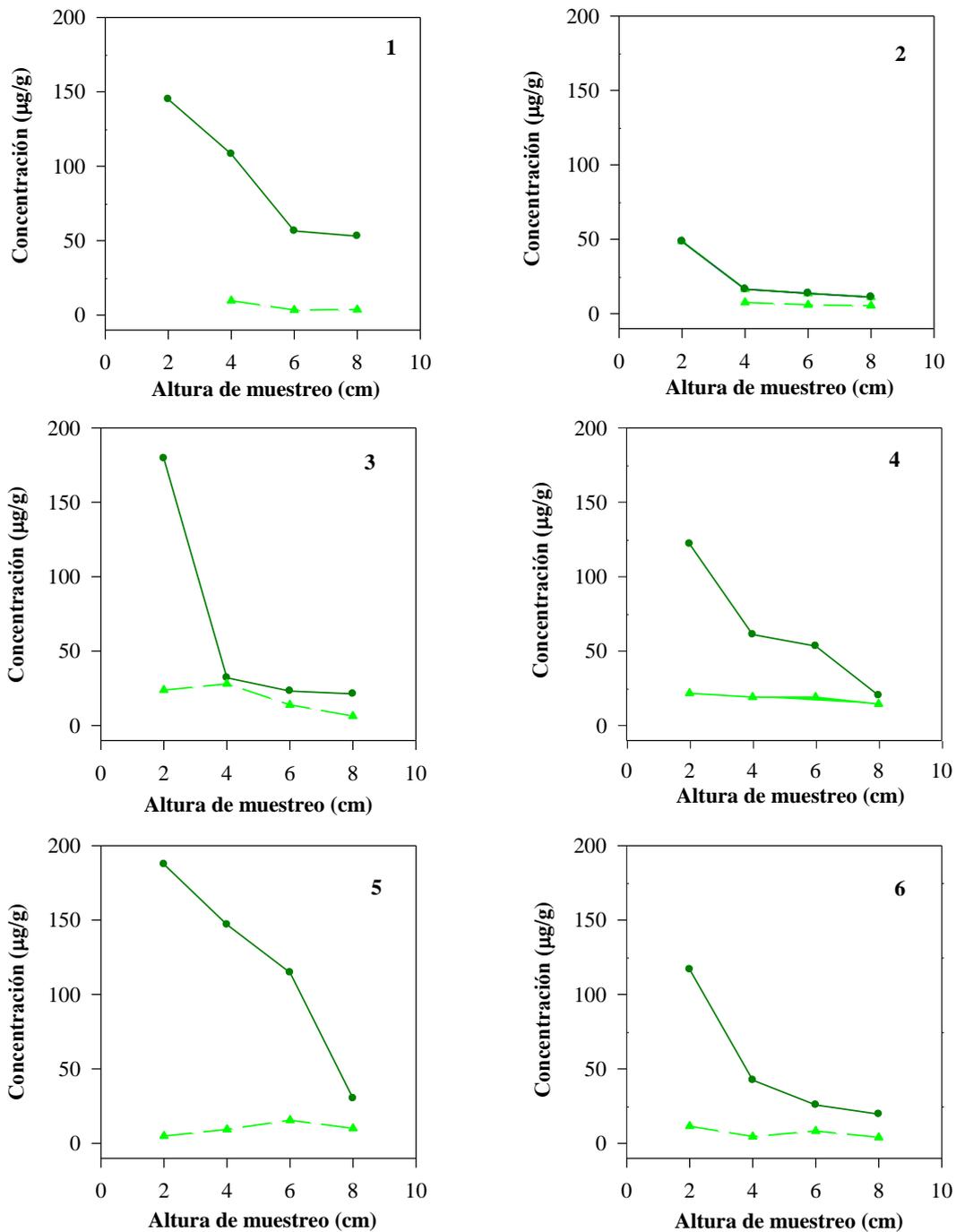
**Tabla 29.** Concentraciones de enrofloxacino ( $\mu\text{g/g}$ ) en tejido mamario contralateral no perfundido a las distintas alturas de muestreo obtenidas tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida.

N° oveja	Altura de muestreo (cm)				
	2	4	6	8	
1	N.D.	9,66	3,33	3,67	
2	N.D.	7,57	5,88	5,36	
3	23,78	27,96	13,88	6,35	
4	21,67	19,08	19,09	14,46	
5	4,96	9,39	15,50	10,06	
6	11,52	4,57	8,31	3,98	
7	1,16	1,47	1,82	N.D.	
	$\bar{x}$	12,62	11,38	9,69	7,31
	DE	9,97	9,13	6,56	4,19
	CV (%)	79,02	80,20	67,74	57,28

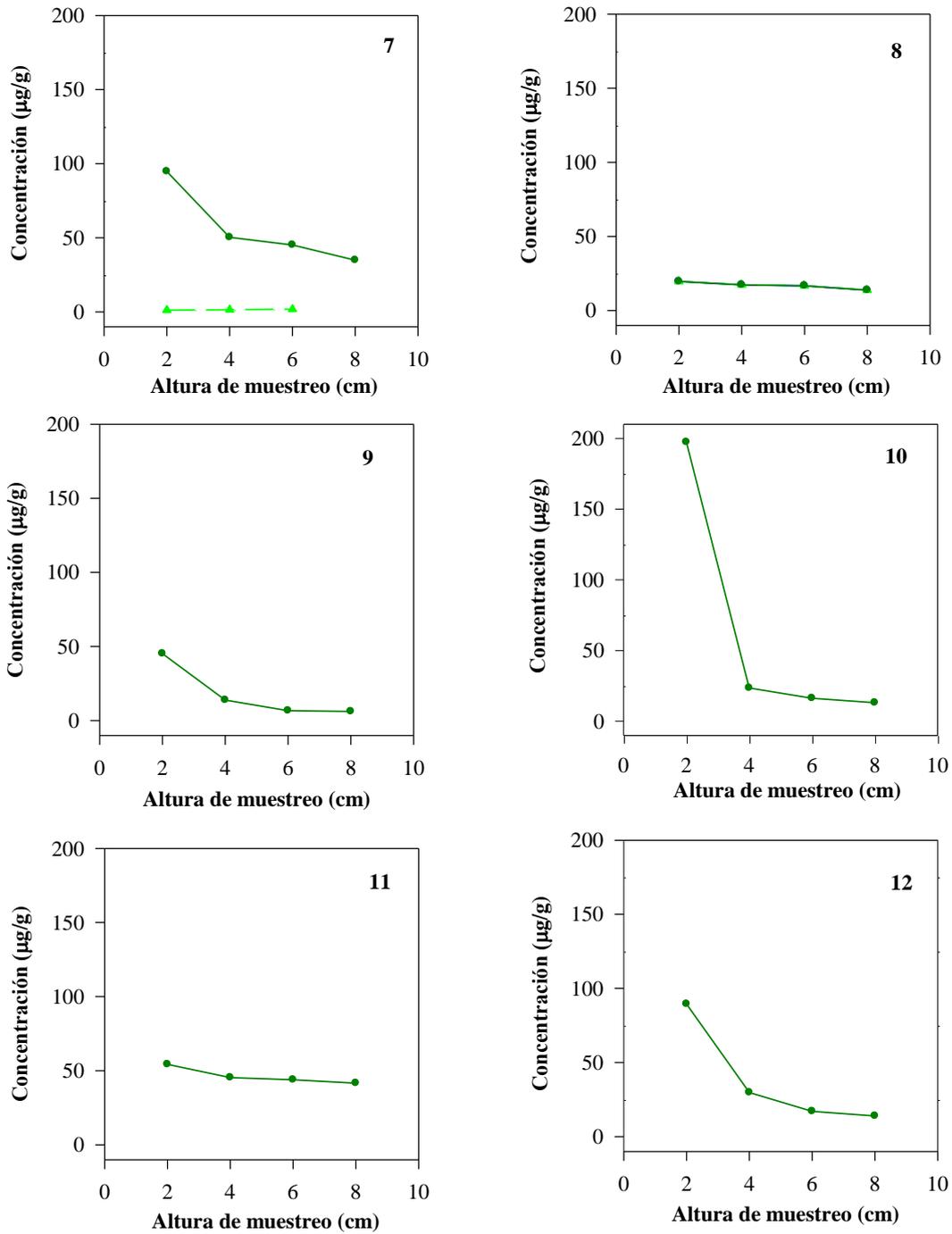
$\bar{x}$  = media, DE = desviación estándar, CV = coeficiente de variación, N.D. = no detectado.

Las figuras 56, 57 y 58 muestran las concentraciones de enrofloxacino frente a la altura de muestreo tanto en la glándula perfundida como en la contralateral no perfundida en cada uno de los animales estudiados. La media de las concentraciones con sus desviaciones estándar frente a la altura, para la glándula perfundida y no perfundida están representadas, a continuación, en la figura 59.

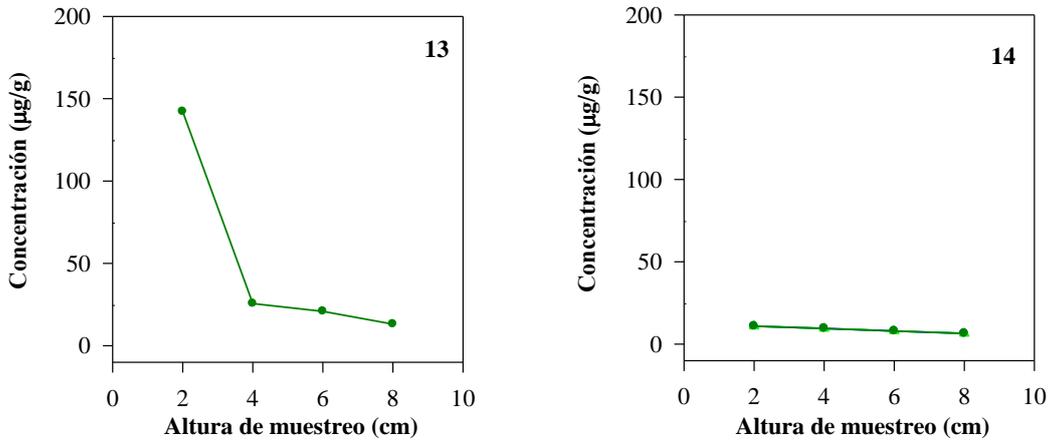
Señalar que, en este grupo sólo se disponen de resultados de concentración de enrofloxacino para la glándula mamaria contralateral no perfundida en 7 de las 14 ovejas, debido a la pérdida accidental de las muestras de biopsia.



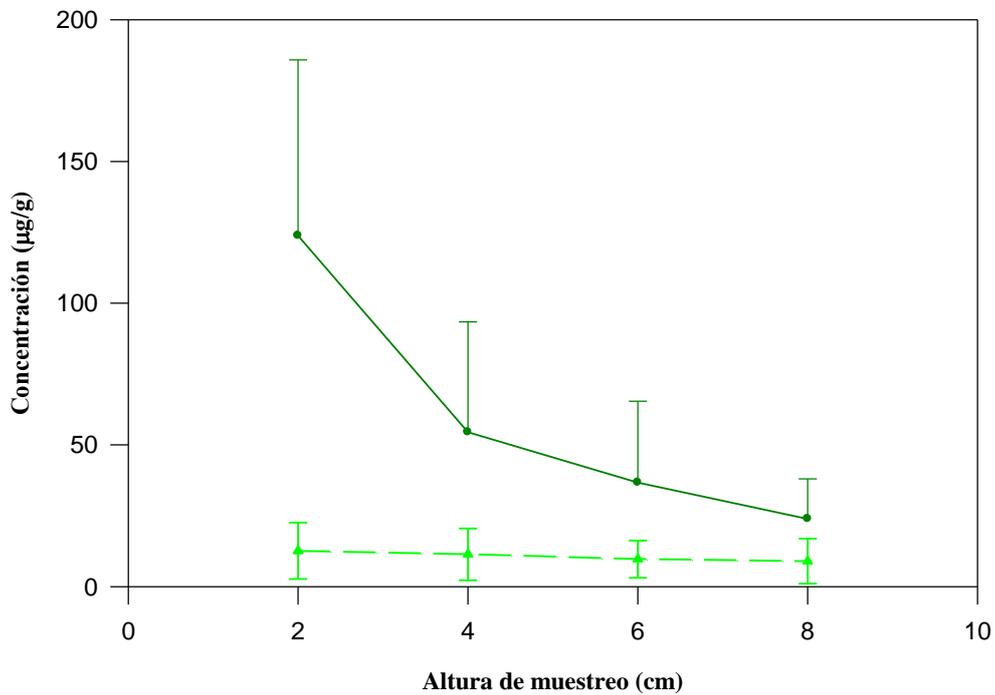
**Figura 56.** Curvas individuales de concentración de enrofloxacino en tejido mamario perfundido (—●—) y en tejido mamario contralateral no perfundido (---▲---) a las distintas alturas de muestreo, tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida. Ovejas 1 a 6.



**Figura 57.** Curvas individuales de concentración de enrofloxacin en tejido mamario perfundido (—●—) y en tejido mamario contralateral no perfundido (---▲---) a las distintas alturas de muestreo, tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacin (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida. Ovejas 7 a 12.



**Figura 58.** Curvas individuales de concentración de enrofloxacino en tejido mamario perfundido (—●—) y en tejido mamario contralateral no perfundido (—▲—) a las distintas alturas de muestreo, tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida. Ovejas 13 y 14.



**Figura 59.** Curva media de concentración de enrofloxacino en tejido mamario perfundido (—●—) (n=14) y en tejido mamario contralateral no perfundido (---▲---) (n=7) a las distintas alturas de muestreo, tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida.

En el caso del tejido mamario perfundido, las concentraciones de enrofloxacino observadas a las distintas alturas oscilaron entre 10,92 y 197,30  $\mu\text{g/g}$  de tejido para las biopsias tomadas a los 2 cm de altura (a partir del pezón), haciéndolo entre 9,56 y 146,92  $\mu\text{g/g}$  de tejido para los 4 cm. Los valores obtenidos a los 6 y 8 cm oscilaron entre 6,70 y 114,70  $\mu\text{g/g}$  de tejido y 6,22 y 53,01  $\mu\text{g/g}$  de tejido, respectivamente.

Puede observarse que tras la administración intramamaria de enrofloxacino, la concentración del fármaco es máxima a nivel cisternal, es decir, a nivel de la biopsia más cercana al pezón (2 cm). Esta concentración desciende de forma progresiva con el aumento de la distancia vertical desde el pezón hacia la base de la mama. Este comportamiento se corresponde con el publicado para otros antibacterianos (bencilpenicilina, oxacilina, ampicilina y alguna cefalosporinas) tras la administración por vía intramamaria (Ehinger y Kietzmann 2000a y b; Ehinger *et al.*, 2006).

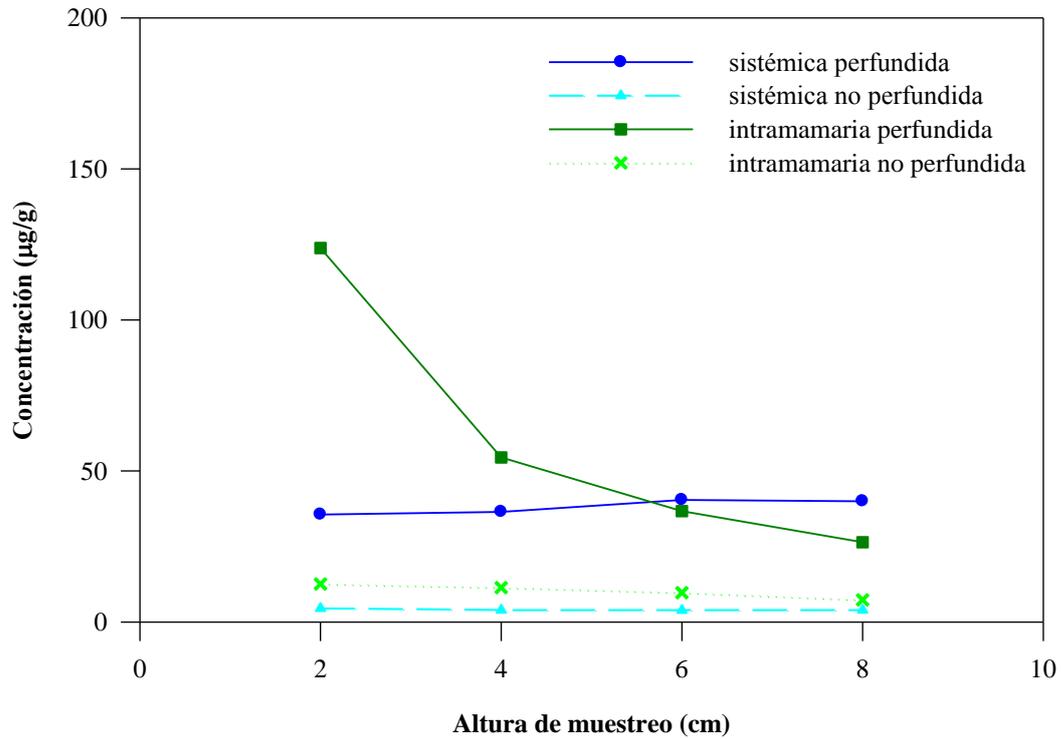
En este estudio y como muestra la tabla 28, se observa una considerable variación de concentraciones de fármaco en el tejido mamario perfundido de una ubre a otra. Este hecho concuerda con los resultados obtenidos en los estudios anteriormente citados (Ehinger y Kietzmann 2000a y b; Ehinger *et al.*, 2006) y es debido a las variaciones individuales que existen en la especie ovina, sobre todo a las diferencias en el tamaño glandular, que está frecuentemente correlacionada con el volumen de secreción (Ehinger y Kietzmann, 1998).

También podemos señalar, la fase de lactación en la que se encuentre la ubre o el estado de salud de la misma (Ehinger *et al.*, 2004). Así se ha observado que en caso de mastitis agudas la permeabilidad vascular se ve aumentada con respecto a ubres sanas, alcanzándose mayores concentraciones de antibiótico en ubres enfermas (Ziv, 1980). Esta variabilidad observada no hace más que reflejar la situación normal en el campo. (Ehinger *et al.*, 2006)

En la tabla 28 puede observarse además, una considerable diferencia entre las concentraciones de enrofloxacino obtenidas a nivel de la primera biopsia (2 cm) con respecto a las otras tres, aspecto que se aprecia mejor al observar las ovejas números 3, 4, 6, 10 y 13. El análisis estadístico realizado indicó que había diferencias significativas entre las concentraciones medias de enrofloxacino obtenidas a los 2 cm de altura con respecto a las otras 3 alturas (4, 6 y 8 cm) (Anova 2 vías y Test de Duncan,  $p \leq 0,05$ ). Este hecho es debido presumiblemente a problemas de difusión relacionados con la proximidad de este punto y la zona donde se realiza la administración de la pomada y fue ya observado con anterioridad por otros autores (Ehinger y Kietzmann 2000a y b; Ehinger *et al.*, 2006).

En cuanto a las concentraciones de enrofloxacino obtenidas en el tejido mamario contralateral no perfundido (tabla 29), se puede observar al igual que ocurría tras la administración *sistémica*, una considerable uniformidad entre los valores obtenidos a las distintas alturas de muestreo. Así, nos encontramos valores medios de 12,618  $\mu\text{g/g}$  de tejido en las biopsias tomadas a los 2 cm de la base del pezón; 11,384  $\mu\text{g/g}$  de tejido en las biopsias tomadas a los 4 cm; 9,687  $\mu\text{g/g}$  de tejido en las biopsias tomadas a los 6 cm y 8,979  $\mu\text{g/g}$  de tejido en las biopsias tomadas a los 8 cm a partir de la base del pezón. No se observaron diferencias significativas entre las concentraciones medias de enrofloxacino obtenidas en los distintos puntos de muestreo (Anova 2 vías,  $p \leq 0,05$ ). También en este caso puede observarse una gran variabilidad interindividual similar a la observada en las ubres perfundidas

Para concluir y según muestra la figura 60, las concentraciones de enrofloxacino encontradas en el tejido mamario, tanto perfundido como no perfundido son, como se esperaba, superiores tras la administración intramamaria con respecto a la vía *sistémica* en las biopsias más próximas al pezón, es decir al lugar de la administración del fármaco (2 y 4 cm) (Malbe *et al.*, 1996). Sin embargo, debe señalarse que al igual que en el estudio llevado a cabo por Ehinger *et al.* (2006), las concentraciones alcanzadas a nivel de la base de la ubre (6 y 8 cm) en el momento de la recogida de las biopsias (180 min) fueron ligeramente superiores tras la administración *sistémica* con respecto a la administración intramamaria en la glándula mamaria perfundida.



**Figura 60.** Concentraciones medias de enrofloxacino en tejido mamario perfundido y en tejido mamario contralateral no perfundido a las distintas alturas de muestreo, tras la administración *sistémica* de 5 mg/kg y tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida (n=12 y n=14 respectivamente).

## 2. Ovejas vivas

### 2.1. Administración intramamaria de enrofloxacino

#### 2.1.1. Plasma

En la tabla 30 se recogen los valores de las concentraciones plasmáticas experimentales para cada oveja, en los diferentes tiempos muestrales establecidos, con sus medias ( $\bar{x}$ ), desviaciones estándar (DE) y coeficientes de variación (CV) para cada una de las ovejas.

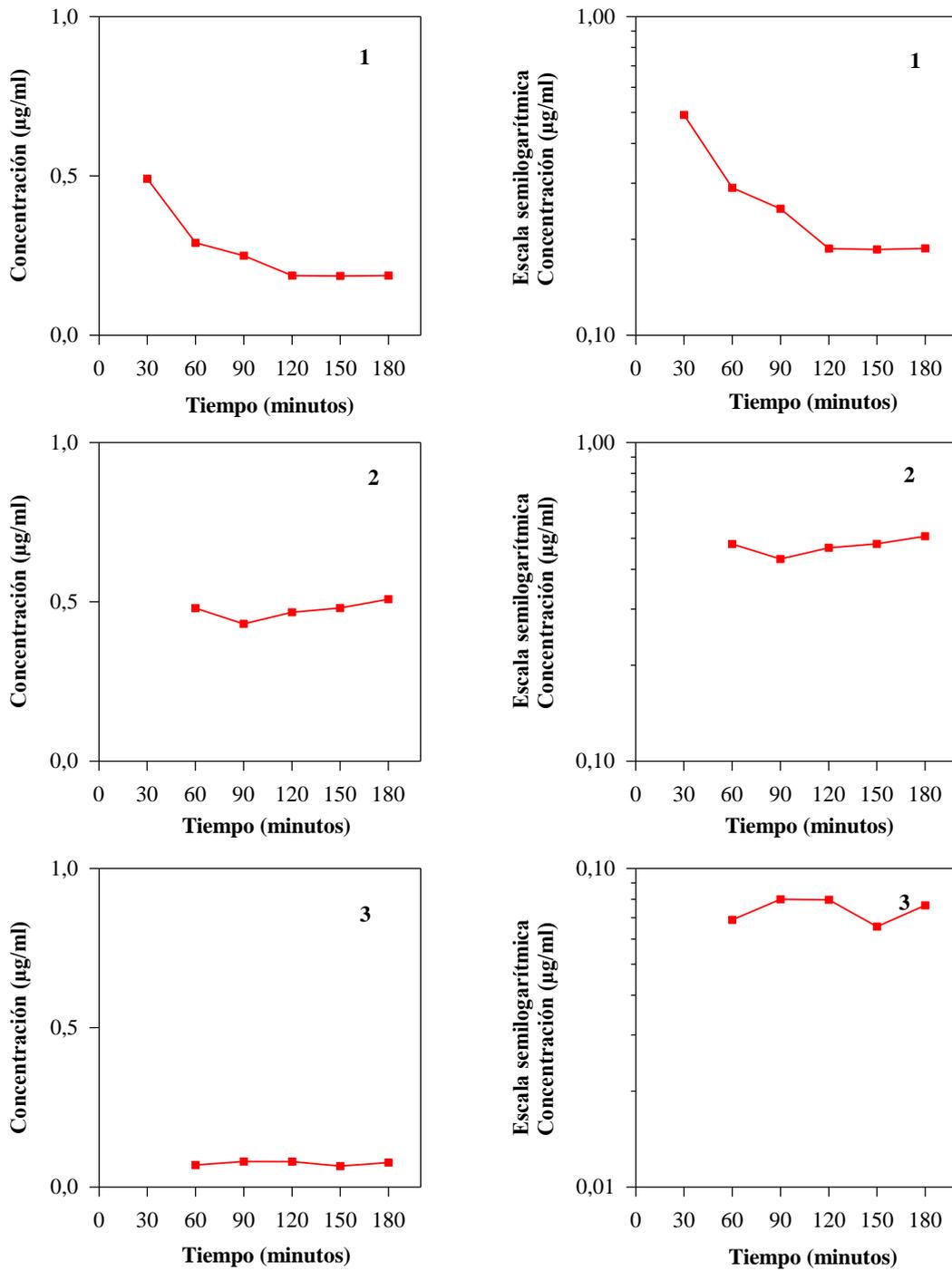
En las figuras 61 y 62 se observa la evolución de las concentraciones plasmáticas de enrofloxacino frente al tiempo, en escala normal y semilogarítmica.

Asimismo, en la figura 63 está representada la media de las concentraciones experimentales con sus desviaciones estándar frente al tiempo, en escala normal y semilogarítmica.

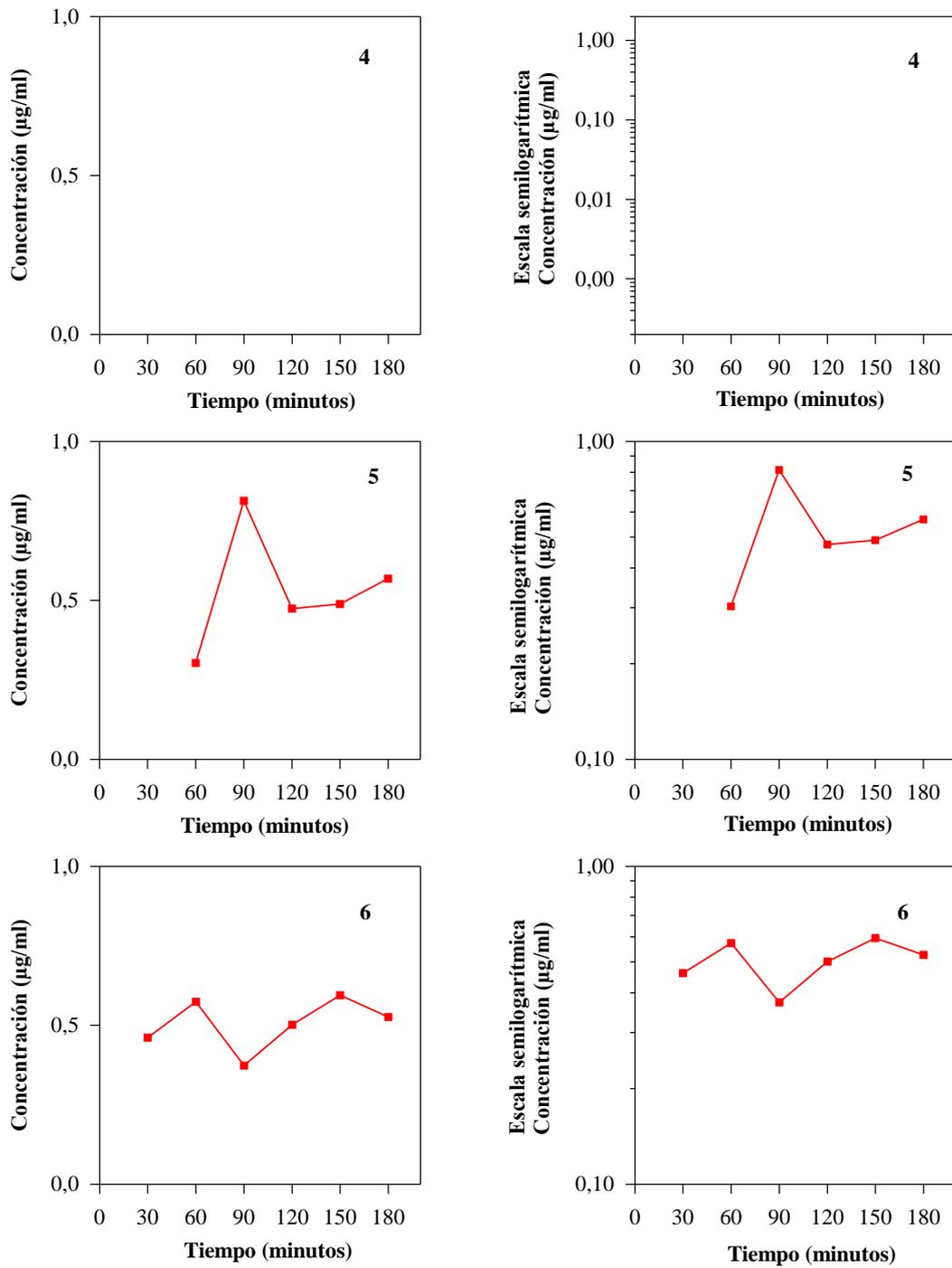
**Tabla 30.** Concentraciones plasmáticas de enrofloxacino ( $\mu\text{g/ml}$ ) obtenidas tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)).

Nº oveja	Tiempo (minutos)						
	30	60	90	120	150	180	
1	0,491	0,290	0,249	0,187	0,186	0,187	
2	N.D.	0,480	0,431	0,467	0,481	0,508	
3	N.D.	0,069	0,080	0,080	0,066	0,077	
4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
5	N.D.	0,303	0,813	0,473	0,489	0,569	
6	0,461	0,574	0,373	0,501	0,594	0,526	
	$\bar{x}$	0,476	0,343	0,389	0,342	0,363	0,373
	DE	0,021	0,195	0,272	0,194	0,225	0,225
	CV (%)	4,46	56,73	70,00	56,83	61,98	60,22

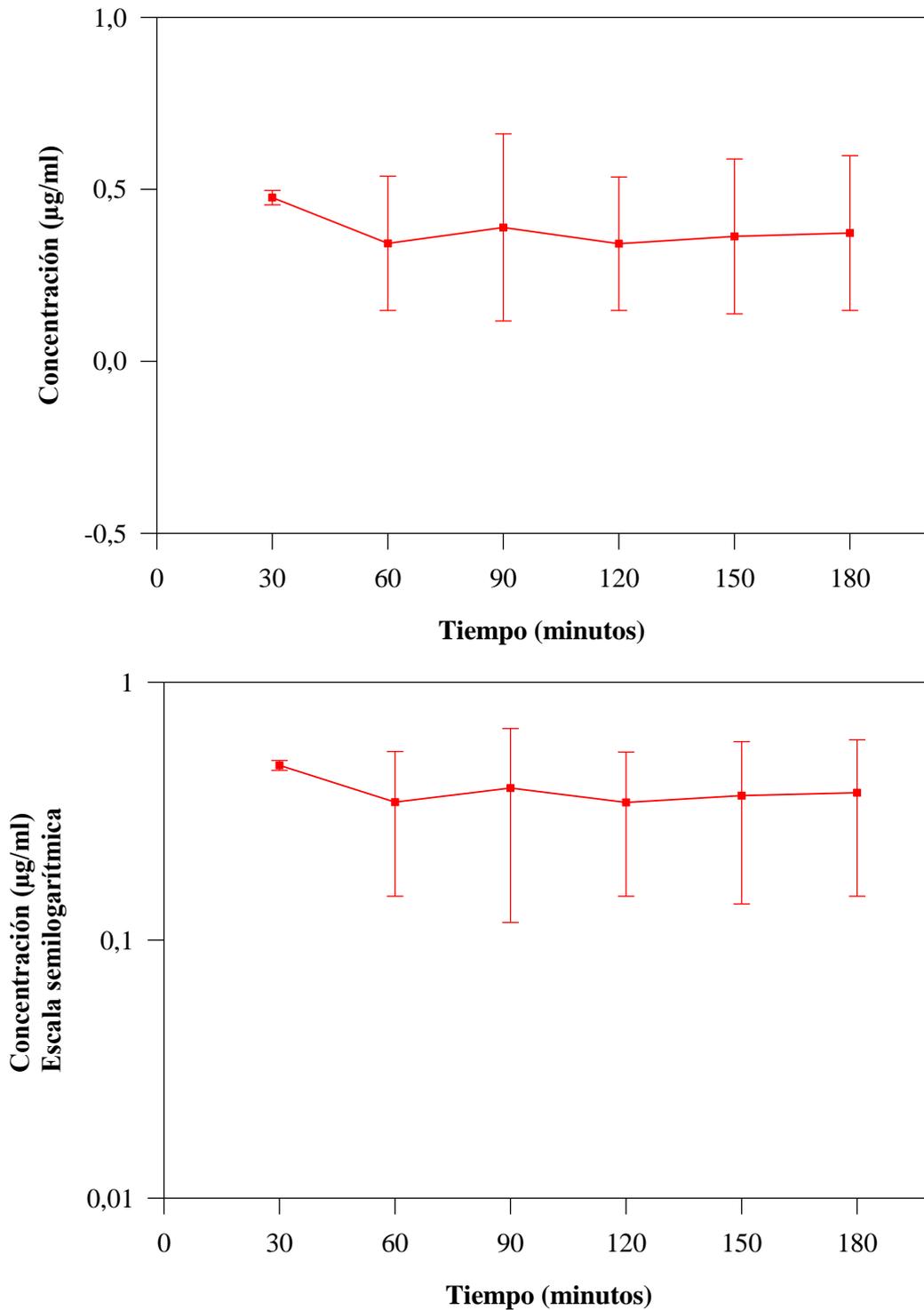
$\bar{x}$  = media, DE = desviación estándar, CV = coeficiente de variación, N.D. = no detectado.



**Figura 61.** Curvas individuales de concentración plasmática experimental-tiempo para el enrofloxacin tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacin (5 g de pomada al 20% (m/m)). Ovejas 1 a 3.



**Figura 62.** Curvas individuales de concentración plasmática experimental-tiempo para el enrofloxacino tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)). Ovejas 4 a 6.



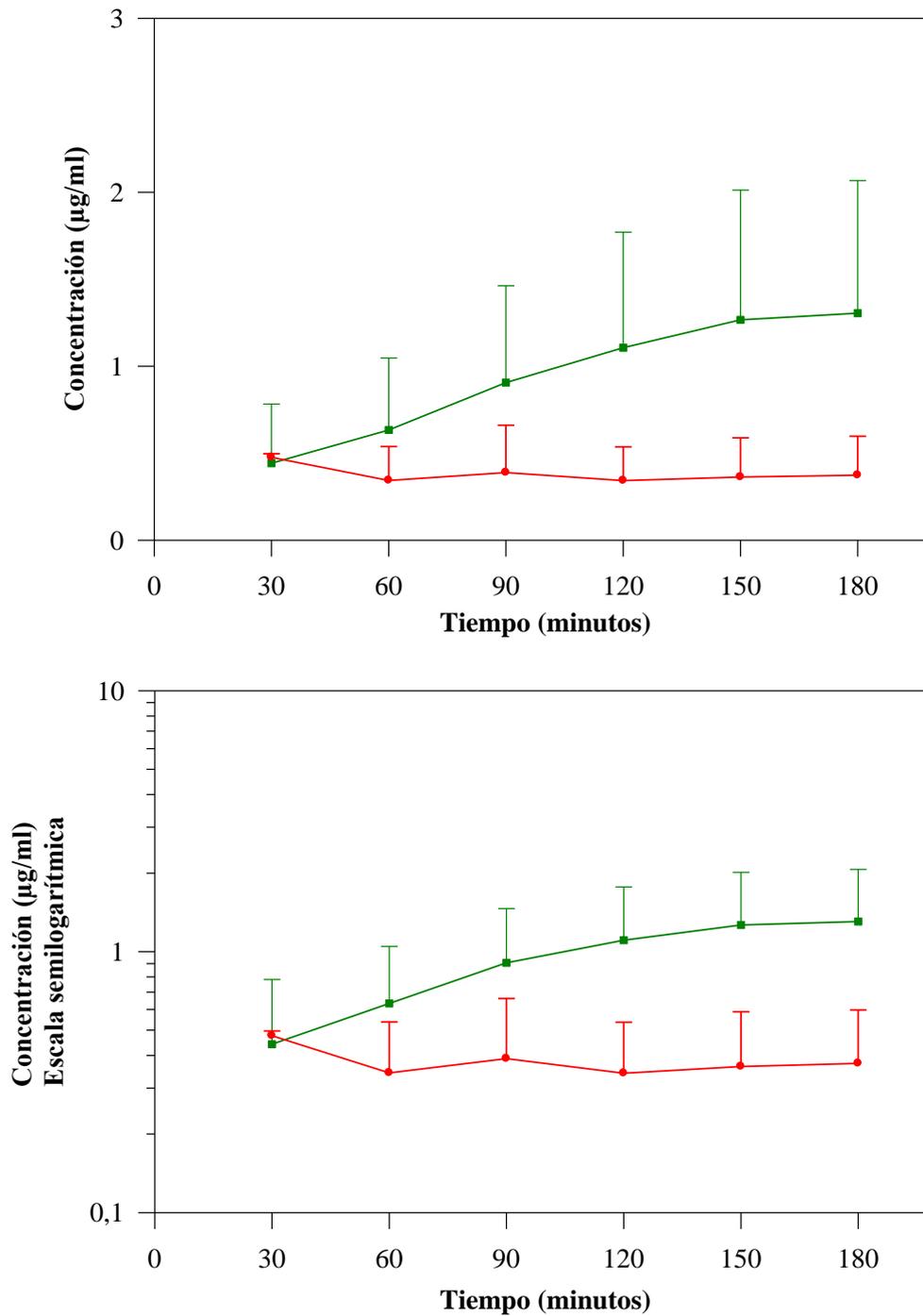
**Figura 63.** Evolución de las concentraciones plasmáticas medias de enrofloxacin tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacin (5 g de pomada al 20% (m/m)) a 6 ovejas vivas.

Con lo que respecta a las concentraciones de enrofloxacino encontradas en plasma tras la administración intramamaria en animales vivos, se puede observar una gran variabilidad individual, tal y como lo reflejan los coeficientes de variación calculados para cada uno de los tiempos de muestreo. En general, se observan coeficientes de variación superiores al 55 %, excepto para la muestra obtenida a los 30 min, donde sólo hay dos animales en los cuales se detectó enrofloxacino y el coeficiente de variación fue del 4,46%.

Los valores medios de concentración obtenidos a los distintos tiempos de muestreo fueron: 0,476 µg/ml (30 min); 0,343 µg/ml (60 min); 0,389 µg/ml (90 min); 0,342 µg/ml (120 min); 0,363 µg/ml (150 min) y 0,373 µg/ml (180 min). Como puede observarse, las concentraciones de antibacteriano en plasma tras la administración intramamaria son bajas en las tres primeras horas y además se mantienen prácticamente constantes a partir de los 60 min.

El hecho de que a los 30 min de la administración sólo hayamos encontrado enrofloxacino en dos de los seis animales indicaría que en el resto la velocidad de absorción es más lenta que en estos animales. En la oveja número 4, la absorción fue demasiado baja como para poder encontrar concentraciones detectables de enrofloxacino en plasma en los distintos tiempos de muestreo establecidos.

En la figura 64 se representan las concentraciones medias de enrofloxacino, tanto en plasma como en solución Tyrode, determinadas tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en ovejas vivas y en el modelo *in vitro* de ubre ovina perfundida, respectivamente. Podemos observar que, en ovejas vivas, las concentraciones obtenidas durante el periodo estudiado (180 min) fueron inferiores a las determinadas *in vitro*. Este hecho puede deberse a que el modelo *in vitro* tiene un volumen de distribución menor y no refleja las condiciones fisiológicas reales de eliminación del fármaco, al carecer de órganos implicados en este proceso tales como el hígado o el riñón. Aunque como se verá más adelante, cabe esperar un mayor paso de fármaco desde la glándula mamaria al torrente circulatorio en la oveja viva, el aumento proporcionalmente mayor del proceso de eliminación explicaría los niveles más bajos de enrofloxacino en plasma.



**Figura 64.** Relación entre las concentraciones medias de enrofloxacino en plasma y solución Tyrode tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en ovejas vivas (—●—) y en el modelo de ubre perfundida (—■—).

### 2.1.2. Tejido mamario

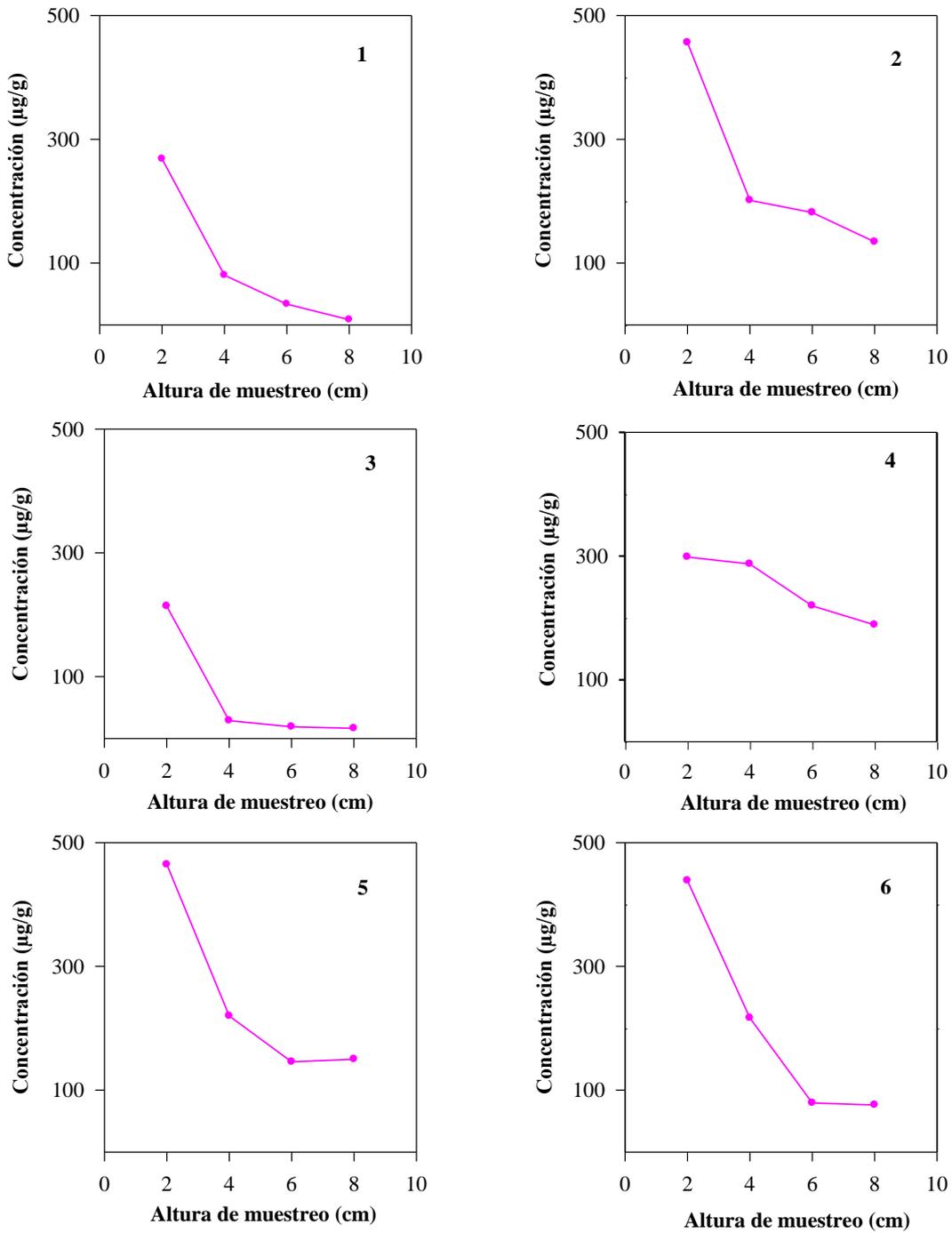
A continuación, en la tabla 31, pueden observarse las concentraciones de enrofloxacino en tejido mamario obtenidas a las distintas alturas de muestreo, con sus medias ( $\bar{x}$ ), desviaciones estándar (DE) y coeficientes de variación (CV) para cada una de las ovejas.

En la figura 65 se muestra la evolución de las concentraciones de enrofloxacino frente a la altura de muestreo. De la misma forma, en la figura 66 está representada la media de las concentraciones con sus desviaciones estándar frente a la altura.

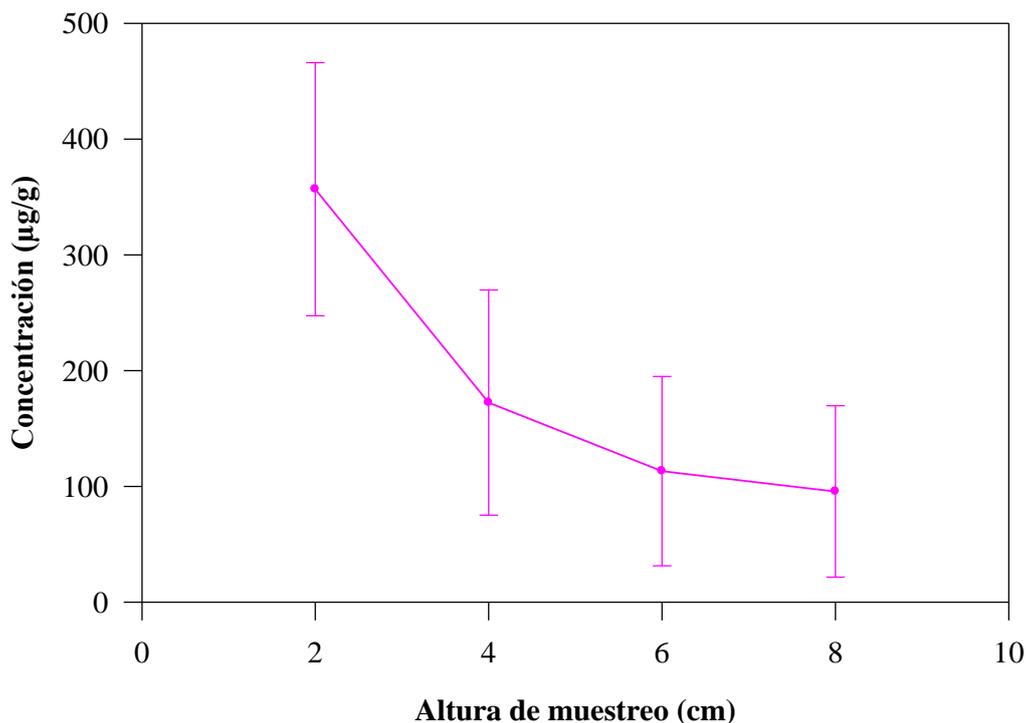
**Tabla 31.** Concentraciones de enrofloxacino ( $\mu\text{g/g}$ ) en tejido mamario obtenidas tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)).

N° oveja	Altura de muestreo (cm)				
	2	4	6	8	
1	268,32	80,36	33,57	8,42	
2	456,11	201,23	181,53	134,12	
3	213,88	28,76	18,73	16,40	
4	298,48	287,30	219,63	188,84	
5	464,45	219,92	145,56	149,84	
6	438,44	216,45	79,31	75,95	
	$\bar{x}$	356,61	172,34	113,06	95,60
	DE	109,34	97,30	81,80	74,00
	CV (%)	30,66	56,46	72,36	77,41

$\bar{x}$  = media, DE = desviación estándar, CV = coeficiente de variación.



**Figura 65.** Curvas individuales de concentración de enrofloxacino en tejido mamario a las distintas alturas de muestreo tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)). Ovejas 1 a 6.



**Figura 66.** Curva media de concentración de enrofloxacino en tejido mamario a las distintas alturas de muestreo tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) a 6 ovejas vivas.

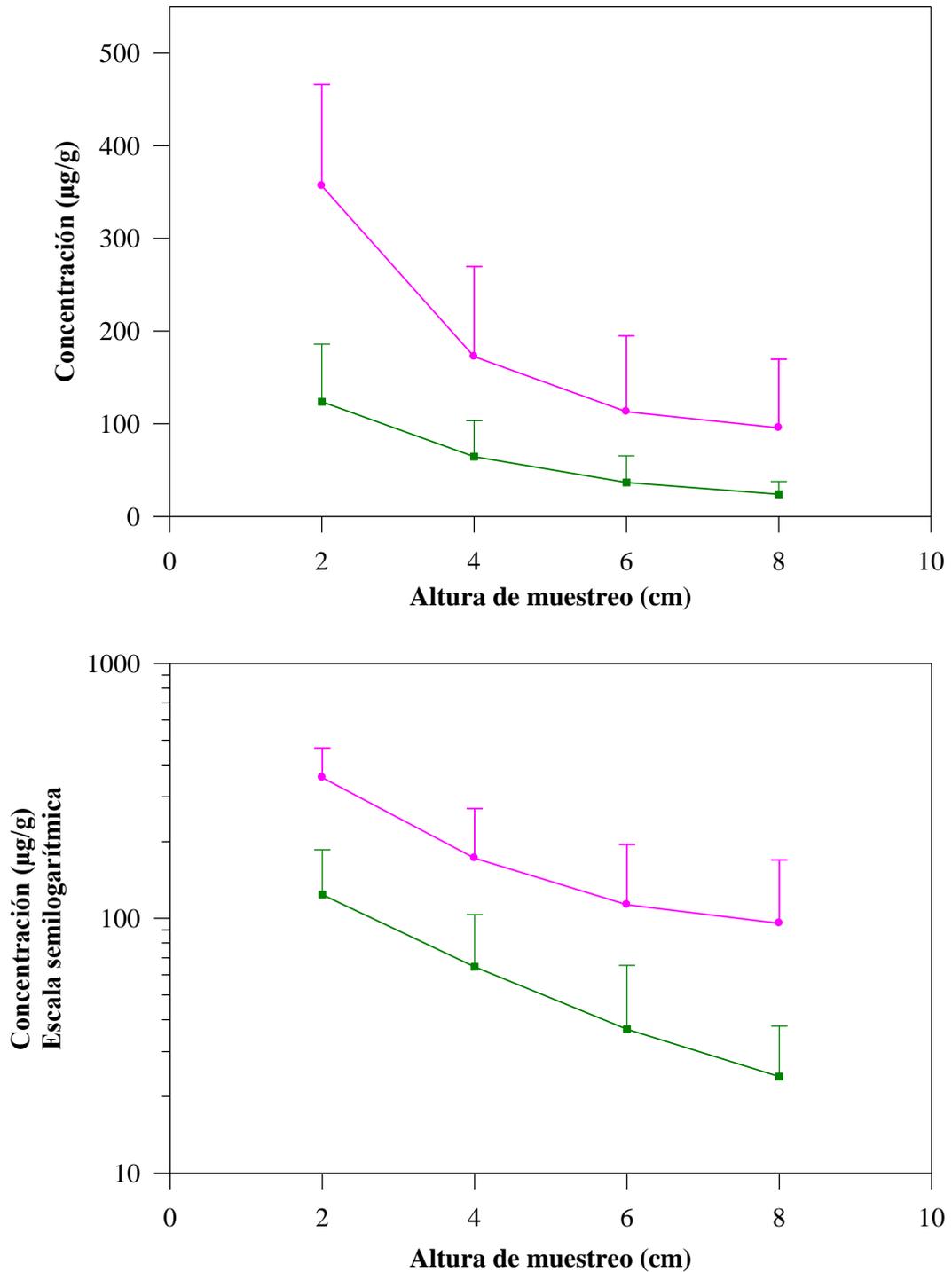
Como acabamos de señalar, en la tabla 31 se observan las concentraciones de enrofloxacino detectadas a las distintas alturas de muestreo. Para las biopsias tomadas a nivel cisternal (2 cm de altura a partir del pezón) los valores oscilaron entre 213,88 y 464,45 µg/g de tejido. Para las biopsias tomadas a los 4 y 6 cm, los valores de concentración oscilaron entre 28,76 y 287,30 µg/g y 18,73 y 219,63 µg/g de tejido, respectivamente.

Finalmente, a nivel de la base de la ubre (8 cm de altura a partir del pezón) se obtuvieron los valores más bajos de concentración, entre 8,42 y 188,84 µg/g de tejido. Según estos datos, se puede observar un descenso progresivo de la concentración de enrofloxacino a medida que aumenta la distancia vertical desde el pezón hacia la base de la mama.

Señalar también, la gran variación que existe entre los animales estudiados, con coeficientes de variación que oscilaron entre el 30,66 y el 77,41%. El estudio estadístico realizado indicó que había diferencias significativas entre las concentraciones medias de enrofloxacino obtenidas a los 2 cm de altura y las obtenidas a los 4, 6 y 8 cm de altura a partir de la base del pezón (Anova de 2 vías y Test de Duncan,  $p \leq 0,05$ ).

Este comportamiento observado *in vivo* se corresponde con el encontrado por nosotros en el modelo *in vitro* de ubre ovina perfundida tras la administración intramamaria, tal y como puede observarse en la figura 67, en la que se representan conjuntamente los resultados obtenidos en ambas situaciones, tanto en escala normal como semilogarítmica. En esta figura se observan concentraciones elevadas de enrofloxacino, tanto en el modelo *in vitro* como en animales vivos, a nivel cisternal (biopsia tomada a los 2 cm del pezón). Este hecho es debido presumiblemente a la proximidad de este punto con el lugar donde se realiza la administración del fármaco.

También podemos observar que las concentraciones de enrofloxacino determinadas en ovejas vivas fueron más altas que las encontradas en el modelo *in vitro*, lo que podría deberse a que nuestro modelo no refleja exactamente las condiciones fisiológicas de los animales vivos. Entre estas diferencias cabe señalar la composición de la solución Tyrode y la sangre o el flujo de perfusión que es menor que el flujo sanguíneo. Por otra parte, el modelo es estático mientras que las ovejas estuvieron en movimiento. Todo ello contribuiría a que la difusión del fármaco fuese mayor en los animales vivos.



**Figura 67.** Relación entre las concentraciones medias de enrofloxacino en tejido mamario a las distintas alturas de muestreo tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en ovejas vivas (—●—) y en el modelo de ubre perfundida (—■—).

Con el fin de encontrar una posible relación entre las concentraciones de enrofloxacino y las alturas a las cuales se toman las muestras, se han ensayo los modelos: lineal y monoexponencial decreciente, obteniéndose las siguientes ecuaciones:

- Modelo lineal:

- ◀ Para el modelo *in vitro* de ubre perfundida

$$\text{Concentración} = 137,830 - 15,495.\text{altura} \quad (r^2 = 0,832 \text{ y } p = 0,088)$$

- ◀ Para ovejas vivas

$$\text{Concentración} = 394,908 - 42,116.\text{altura} \quad (r^2 = 0,829 \text{ y } p = 0,089)$$

- Modelo monoexponencial decreciente:

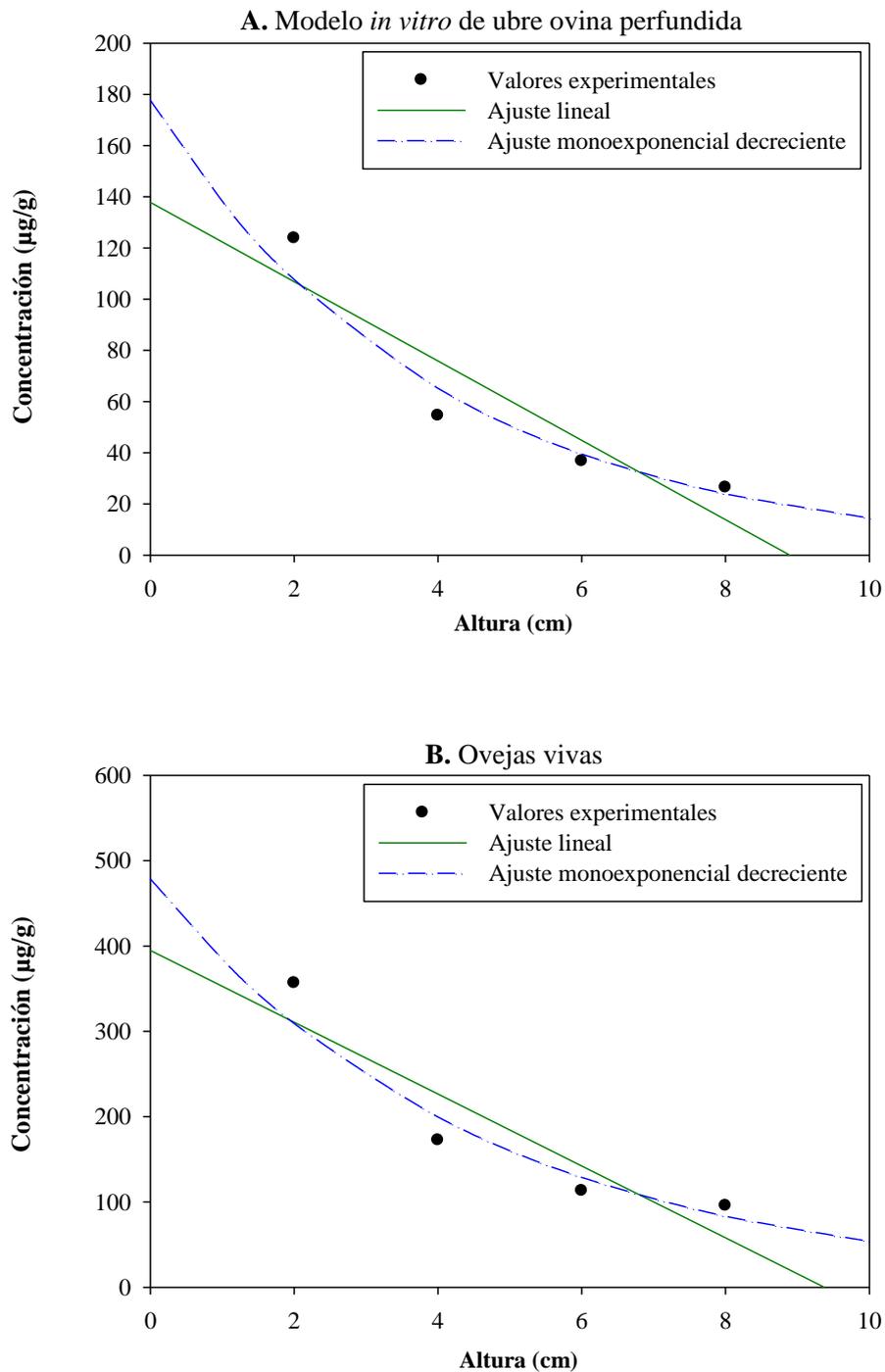
- ◀ Para el modelo *in vitro* de ubre perfundida

$$\text{Concentración} = 177,776.e^{-0,251.\text{altura}} \quad (r^2 = 0,950 \text{ y } p = 0,025)$$

- ◀ Para ovejas vivas

$$\text{Concentración} = 478,804.e^{-0,219.\text{altura}} \quad (r^2 = 0,924 \text{ y } p = 0,039)$$

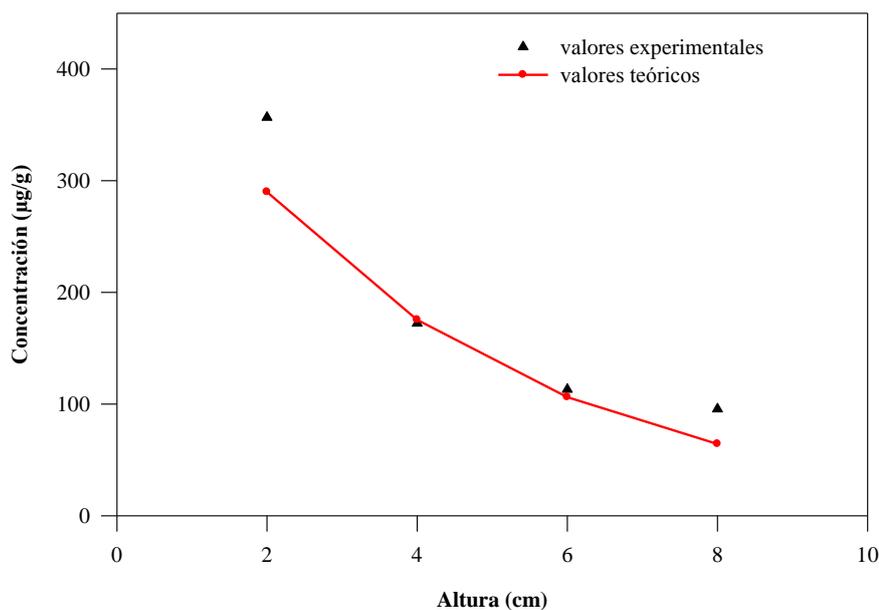
En la figura 68 se representa la correspondencia entre los valores experimentales y los teóricos calculados con los modelos lineal y monoexponencial decreciente obtenidos, tanto en el modelo *in vitro* como en ovejas vivas.



**Figura 68.** Valores experimentales de las concentraciones medias de enrofloxacin en tejido mamario a las distintas alturas de muestreo tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacin (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo *in vitro* (A) y en ovejas vivas (B) y sus ajustes correspondientes realizados con el modelo lineal y monoexponencial decreciente.

Teniendo en cuenta estos resultados, el modelo monoexponencial decreciente es el que mejor ajusta los datos experimentales. Puede observarse que la pendiente es muy parecida en ambos casos, lo que indicaría que la cinética de difusión es similar, y que partiendo de los valores de los coeficientes obtenidos en ambos modelos pueden predecirse los valores de concentración *in vivo* a las distintas alturas de muestreo, únicamente multiplicando su valor *in vitro* por: 2,693 o bien utilizando la ecuación:  $\text{Concentración} = 478,804 \cdot e^{-0,251 \cdot \text{altura}}$ .

En la figura 69 puede observarse la correspondencia entre los valores teóricos *in vivo* predichos utilizando dicha ecuación y los valores experimentales *in vivo* obtenidos.



**Figura 69.** Representación gráfica de los valores teóricos *in vivo* predichos utilizando la ecuación:  $\text{Concentración} = 478,804 \cdot e^{-0,251 \cdot \text{altura}}$  y los valores medios experimentales *in vivo*.

Evaluando en conjunto los resultados obtenidos en los diferentes ensayos realizados con nuestro modelo *in vitro*, podemos afirmar que es adecuado para caracterizar los procesos de paso del fármaco desde el líquido Tyrode al tejido mamario y viceversa, y especialmente para estudiar las características de distribución del fármaco en el tejido mamario mediante la determinación de sus concentraciones a distintas alturas. El modelo propuesto tendría su mayor utilidad en el estudio de las variaciones que se pueden producir en función de la dosis administrada y de las características de las diferentes formulaciones en que se presente el fármaco; ambas van a determinar cambios en la difusión tisular y en su transferencia a sangre y leche. Teniendo en cuenta la utilización que se hace de la vía intramamaria en la práctica clínica, la principal aplicación de este modelo sería en el estudio de formulaciones de antimicrobianos para el tratamiento de la mastitis.

### 3. Relación farmacocinética/farmacodinamia (Pk/Pd)

Existen tres indicadores que definen/predicen la eficacia terapéutica de los antibacterianos. Uno de ellos viene representado por el cociente entre la  $C_{\max}$  y la concentración mínima inhibitoria (CIM), otro por el cociente entre el  $AUC_{0-24h}$  y la CIM (AUC) y el último hace referencia al tiempo en que la concentración del antibacteriano excede la CIM ( $T > CIM$ ). Estos parámetros no son más que el resultado de correlacionar una medida de exposición de la bacteria al fármaco, expresada mediante los parámetros farmacocinéticos  $C_{\max}$  y AUC, frente a una medida de la potencia del antibacteriano frente a la bacteria de interés, expresada por el parámetro farmacodinámico CIM (Hyatt *et al.*, 1995; Lode *et al.*, 1998; Schentag, 1999; Pickerill *et al.*, 2000; Schentag *et al.*, 2001; Mckellar *et al.*, 2004).

Por su parte, los antibacterianos pueden clasificarse en dos grupos; antibacterianos concentración dependientes y antibacterianos tiempo dependientes. Los antibacterianos tiempo dependientes, son aquellos en los cuales la importancia del tiempo de exposición al antibacteriano es mayor que la concentración máxima alcanzada, y la eficacia dependerá de la relación  $AUC_{0-24h} / CIM$  (AUC). Dentro de este grupo se encuentran entre otros los  $\beta$ -lactámicos y los macrólidos (Owens y Ambrose, 2002a; Mckellar *et al.*, 2004). Diversos estudios han publicado que los valores de AUC necesarios para asegurar el éxito terapéutico de los antibacterianos son diferentes para infecciones causadas por Gram negativos y Gram positivos. Para organismos Gram negativos, el valor de  $AUC_{0-24h} / CIM$  necesario se establece entre 100 y 125, mientras que para los microorganismos Gram positivos este valor es considerablemente menor, del orden de 30 a 50 (Drusano *et al.*, 1993; Forrest *et al.*, 1993; Craig, 1998b; Preston *et al.*, 1998; Nightingale *et al.*, 2000; Walker, 2000; Wright *et al.*, 2000; Ibrahim *et al.*, 2002).

El AUC también sirve como índice Pk/Pd cuando la infección está provocada por bacterias de crecimiento lento, cuando existe poco o nulo efecto postantibiótico, o cuando las CIM de los microorganismos son bajas (Marín, 2008).

En cuanto a los antibacterianos concentración dependientes es decir, aquellos en los cuales la acción bactericida aumenta a medida que aumenta la concentración

del fármaco, el mejor indicador Pk/Pd para predecir su eficacia es la relación  $C_{\max}/CIM$ . Dentro de este grupo se encuentran tanto las fluoroquinolonas (enrofloxacino) como los aminoglucósidos y el metronidazol. Los distintos estudios llevados a cabo al respecto, revelan que este cociente debería estar entre 8 y 10. De esta forma, se asegura la mortalidad de los microorganismos más sensibles y se produce un aumento de la mortalidad o de la inhibición del crecimiento de bacterias con altos valores de CIM, es decir menos sensibles (Craig, 1998b; Craig y Dalhoff, 1998a; Zhanel, 2001; Toutain *et al.*, 2002; Papich y Riviere, 2003; Mckellar *et al.*, 2004; Toutain *et al.*, 2004).

De forma general y a modo de resumen, podemos decir que la CIM del enrofloxacino para los microorganismos patógenos más sensibles causantes de enfermedad en el ganado ovino oscila entre 0,008 y 0,06  $\mu\text{g/ml}$ , siendo la CIM para microorganismos sensibles del orden de 0,125 a 0,5  $\mu\text{g/ml}$  y para los menos sensibles igual a 0,5  $\mu\text{g/ml}$  (Scheer, 1987b; Prescott y Yielding, 1990; Böttner *et al.*, 1995; Steeve *et al.*, 1996; Wallmann, 2006; Otero *et al.*, 2009).

A continuación se relacionarán las concentraciones de enrofloxacino obtenidas en solución Tyrode y tejido mamario, tanto tras la administración *sistémica* como intramamaria, en el modelo *in vitro* de ubre ovina perfundida, con las CIMs antes señaladas. Asimismo, se relacionarán las concentraciones plasmáticas y tisulares obtenidas *in vivo* tras la administración intramamaria. En todos los casos, se tomarán como referencia las CIMs de algunos microorganismos patógenos causantes de mastitis en el ganado ovino: *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma agalactiae* (CIM = 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ); *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp. (CIM = 0,06  $\mu\text{g/ml}$ ) y *Pasteurella haemolytica* (CIM = 0,03  $\mu\text{g/ml}$ ) (Wegener *et al.*, 1994; Haritova *et al.*, 2003; Lorian *et al.*, 2003).

Señalar además, que como  $C_{\max}$  hemos adoptado la concentración media de enrofloxacino obtenida a los distintos tiempos de muestreo en solución Tyrode y plasma. En las muestras de tejido mamario se han utilizado las concentraciones medias de enrofloxacino obtenidas a las distintas alturas de muestreo, recogidas al finalizar el tiempo de perfusión (180 min).

**Tabla 32.** Eficacia antibacteriana del enrofloxacin en solución Tyrode tras la administración *sistémica* de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida.

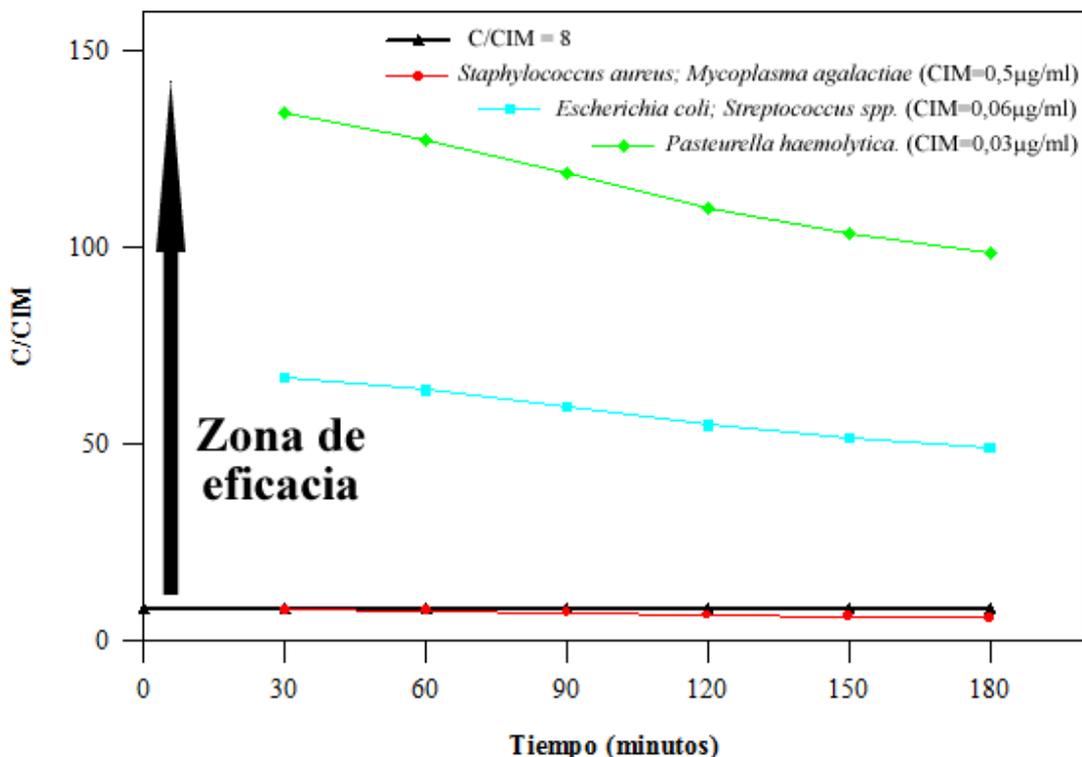
Tiempo (min)	Concentración de enrofloxacin (C) (µg/ml)	Microorganismos (sensibilidad)	CIM (µg/ml)	C/CIM	
30	4,024	menos sensibles +	<i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1 0,5	4,02 8,05 (a)
		sensibles ++		0,125	32,19
		mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp. Pasteurella haemolytica</i>	0,06 0,03 0,008	67,07 134,13 503,00
		menos sensibles +	<i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1 0,5	3,83 7,65 (a)
		sensibles ++		0,125	30,60
		mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp. Pasteurella haemolytica</i>	0,06 0,03 0,008	63,75 127,50 478,13
60	3,825	menos sensibles +	<i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1 0,5	3,57 7,14 (a)
		sensibles ++		0,125	28,56
		mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp. Pasteurella haemolytica</i>	0,06 0,03 0,008	59,50 119,00 446,25
		menos sensibles +	<i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1 0,5	3,30 6,59 (a)
		sensibles ++		0,125	26,37
		mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp. Pasteurella haemolytica</i>	0,06 0,03 0,008	54,93 109,87 412,00
90	3,570	menos sensibles +	<i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1 0,5	3,11 6,21 (a)
		sensibles ++		0,125	24,84
		mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp. Pasteurella haemolytica</i>	0,06 0,03 0,008	51,75 103,50 388,13
		menos sensibles +	<i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1 0,5	2,96 5,91 (a)
		sensibles ++		0,125	23,64
		mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp. Pasteurella haemolytica</i>	0,06 0,03 0,008	49,25 98,50 369,38
120	3,296	menos sensibles +	<i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1 0,5	2,96 5,91 (a)
		sensibles ++		0,125	23,64
		mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp. Pasteurella haemolytica</i>	0,06 0,03 0,008	49,25 98,50 369,38
		menos sensibles +	<i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1 0,5	2,96 5,91 (a)
		sensibles ++		0,125	23,64
		mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp. Pasteurella haemolytica</i>	0,06 0,03 0,008	49,25 98,50 369,38
150	3,105	menos sensibles +	<i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1 0,5	2,96 5,91 (a)
		sensibles ++		0,125	23,64
		mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp. Pasteurella haemolytica</i>	0,06 0,03 0,008	49,25 98,50 369,38
		menos sensibles +	<i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1 0,5	2,96 5,91 (a)
		sensibles ++		0,125	23,64
		mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp. Pasteurella haemolytica</i>	0,06 0,03 0,008	49,25 98,50 369,38
180	2,955	menos sensibles +	<i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1 0,5	2,96 5,91 (a)
		sensibles ++		0,125	23,64
		mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp. Pasteurella haemolytica</i>	0,06 0,03 0,008	49,25 98,50 369,38
		menos sensibles +	<i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1 0,5	2,96 5,91 (a)
		sensibles ++		0,125	23,64
		mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp. Pasteurella haemolytica</i>	0,06 0,03 0,008	49,25 98,50 369,38

CIM = 0,5 µg/ml (*Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma agalactiae*); CIM = 0,06 µg/ml (*Escherichia coli* y *Streptococcus spp*) y CIM = 0,03 µg/ml (*Pasteurella haemolytica*). (a) = Falta de eficacia: no se supera el límite inferior para el cociente C/CIM  $\geq$  8.

En primer lugar y con lo que respecta a la administración *sistémica* de enrofloxacino en el modelo *in vitro* de ubre ovina perfundida (tabla 32) podemos observar que, tras la administración de una dosis de 5 mg/kg se alcanzan concentraciones eficaces de enrofloxacino en solución Tyrode frente a la mayoría de los microorganismos patógenos clasificados como sensibles y más sensibles, es decir frente aquellos microorganismos cuyo CIM sea menor de 0,37 µg/ml.

En cuanto a la eficacia específica contra los principales microorganismos causantes de mastitis, se puede observar que sólo en el primer tiempo de muestreo (30 min) se alcanzan concentraciones adecuadas ( $C/CIM > 8$ ) frente a los cinco microorganismos señalados anteriormente, mientras que en el resto de los tiempos muestreados, sólo se observa eficacia frente a *Escherichia coli*, *Streptococcus spp* (CIM = 0,06 µg/ml) y *Pasteurella haemolytica* (CIM = 0,03 µg/ml) pero no frente a *Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma agalactiae* (CIM = 0,5 µg/ml).

En la figura 70 se observa la representación gráfica de la eficacia del enrofloxacino en solución Tyrode, tras la administración *sistémica* de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida, teniendo en cuenta los valores de CIM para los microorganismos a los cuales nos hemos referido anteriormente: CIM = 0,5 µg/ml (*Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma agalactiae*); CIM = 0,06 µg/ml (*Escherichia coli* y *Streptococcus spp*) y CIM = 0,03 µg/ml (*Pasteurella haemolytica*).



**Figura 70.** Eficacia antibacteriana del enrofloxacino en solución Tyrode tras la administración *sistémica* de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida.

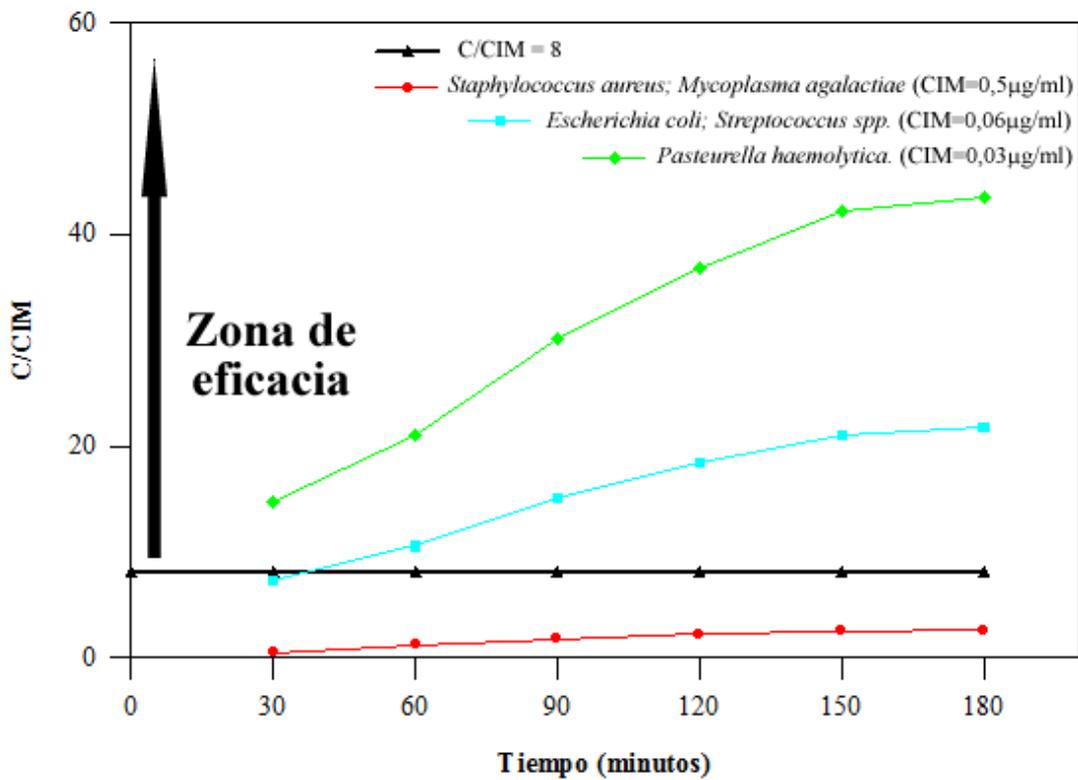
En segundo lugar y tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) (tabla 33) las concentraciones obtenidas en solución Tyrode son inferiores a las alcanzadas tras la administración *sistémica*, sin embargo se alcanzan concentraciones eficaces frente a los microorganismos más sensibles causantes de enfermedad (CIM < 0,125 µg/ml). Como ya se mencionó en su momento, a medida que aumenta el tiempo de perfusión aumenta también la concentración de enrofloxacino en solución Tyrode, y con ella la eficacia frente a microorganismos con una CIM mayor. En la tabla 33 puede observarse que a partir de los 60 min de la administración intramamaria se alcanzan ya concentraciones de enrofloxacino eficaces frente a *Escherichia coli*, *Streptococcus spp.* y *Pasteurella haemolytica*, pero todavía no frente a *Staphylococcus aureus* o *Mycoplasma agalactiae*.

**Tabla 33.** Eficacia antibacteriana del enrofloxacino en solución Tyrode tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida.

Tiempo (min)	Concentración de enrofloxacino (C) (µg/ml)	Microorganismos (sensibilidad)	CIM (µg/ml)	C/CIM		
30	0,442	menos sensibles +	<i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1	0,44	(a)
				0,5	0,50	(a)
		sensibles ++		0,125	3,54	(a)
				<i>Escherichia coli; Streptococcus spp. Pasteurella haemolytica</i>	0,06	7,37
		mas sensibles +++			0,03	14,73
				0,008	55,25	
60	0,633	menos sensibles +	<i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1	0,63	(a)
				0,5	1,27	(a)
		sensibles ++		0,125	5,06	(a)
				<i>Escherichia coli; Streptococcus spp. Pasteurella haemolytica</i>	0,06	10,55
		mas sensibles +++			0,03	21,10
				0,008	79,13	
90	0,906	menos sensibles +	<i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1	0,91	(a)
				0,5	1,81	(a)
		sensibles ++		0,125	7,25	(a)
				<i>Escherichia coli; Streptococcus spp. Pasteurella haemolytica</i>	0,06	15,10
		mas sensibles +++			0,03	30,20
				0,008	113,25	
120	1,106	menos sensibles +	<i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1	1,11	(a)
				0,5	2,21	(a)
		sensibles ++		0,125	8,85	
				<i>Escherichia coli; Streptococcus spp. Pasteurella haemolytica</i>	0,06	18,43
		mas sensibles +++			0,03	36,87
				0,008	138,25	
150	1,266	menos sensibles +	<i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1	1,27	(a)
				0,5	2,53	(a)
		sensibles ++		0,125	10,13	
				<i>Escherichia coli; Streptococcus spp. Pasteurella haemolytica</i>	0,06	21,10
		mas sensibles +++			0,03	42,20
				0,008	158,25	
180	1,305	menos sensibles +	<i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1	1,31	(a)
				0,5	2,61	(a)
		sensibles ++		0,125	10,44	
				<i>Escherichia coli; Streptococcus spp. Pasteurella haemolytica</i>	0,06	21,75
		mas sensibles +++			0,03	43,50
				0,008	163,13	

CIM = 0,5 µg/ml (*Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma agalactiae*); CIM = 0,06 µg/ml (*Escherichia coli* y *Streptococcus spp.*) y CIM = 0,03 µg/ml (*Pasteurella haemolytica*). (a) = Falta de eficacia: no se supera el límite inferior para el cociente C/CIM  $\geq$  8.

Al igual que en el caso de la administración *sistémica*, en la figura 71 se observa la representación gráfica de la eficacia del enrofloxacino en solución Tyrode, tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida, teniendo en cuenta los valores de CIM para los microorganismos a los que nos venimos refiriendo: CIM = 0,5 µg/ml (*Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma agalactiae*); CIM = 0,06 µg/ml (*Escherichia coli* y *Streptococcus spp.*) y CIM = 0,03 µg/ml (*Pasteurella haemolytica*).



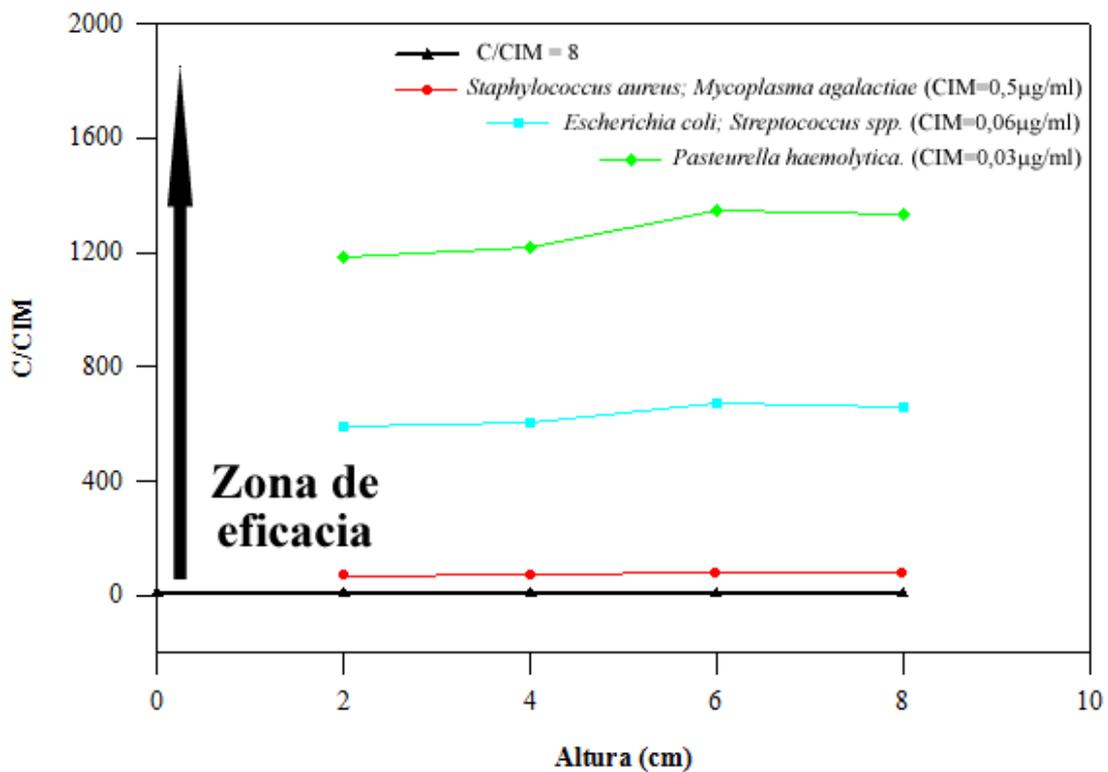
**Figura 71.** Eficacia antibacteriana del enrofloxacino en solución Tyrode tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida.

Las tablas 34, 35, 36 y 37 muestran las concentraciones medias de enrofloxacino obtenidas en tejido mamario perfundido y en tejido mamario contralateral no perfundido a las distintas alturas de muestreo, tanto tras la administración *sistémica* como, tras la administración intramamaria en el modelo *in vitro* de ubre ovina perfundida, finalizado el periodo de perfusión (180 min).

**Tabla 34.** Concentración media de enrofloxacino en tejido mamario perfundido a las distintas alturas de muestreo, tras la administración *sistémica* de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida (n=12).

Altura (cm)	Concentración de enrofloxacino (C) (µg/g)	Microorganismos (sensibilidad)	CIM (µg/ml)	C/CIM	
2	35,58	menos sensibles +   <i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1	35,58	
			0,5	71,16	
		sensibles ++	0,125	284,64	
		mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp.</i> <i>Pasteurella haemolytica</i>	0,06	593,00
				0,03	1186,00
				0,008	4447,50
4	36,45	menos sensibles +   <i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1	36,45	
			0,5	72,90	
		sensibles ++	0,125	291,60	
		mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp.</i> <i>Pasteurella haemolytica</i>	0,06	607,50
				0,03	1215,00
				0,008	4556,25
6	40,38	menos sensibles +   <i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1	40,38	
			0,5	80,76	
		sensibles ++	0,125	323,04	
		mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp.</i> <i>Pasteurella haemolytica</i>	0,06	673,00
				0,03	1346,00
				0,008	5047,50
8	39,97	menos sensibles +   <i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1	39,97	
			0,5	79,94	
		sensibles ++	0,125	319,76	
		mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp.</i> <i>Pasteurella haemolytica</i>	0,06	666,17
				0,03	1332,33
				0,008	4996,25

Asimismo, las figuras 72, 73, 74 y 75 muestran la representación gráfica de la eficacia del enrofloxacin tanto en el tejido mamario perfundido como en el no perfundido, tras la administración *sistémica* e intramamaria, teniendo en cuenta los valores de CIM para los microorganismos utilizados como referencia: CIM = 0,5 µg/ml (*Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma agalactiae*); CIM = 0,06 µg/ml (*Escherichia coli* y *Streptococcus spp*) y CIM = 0,03 µg/ml (*Pasteurella haemolytica*).

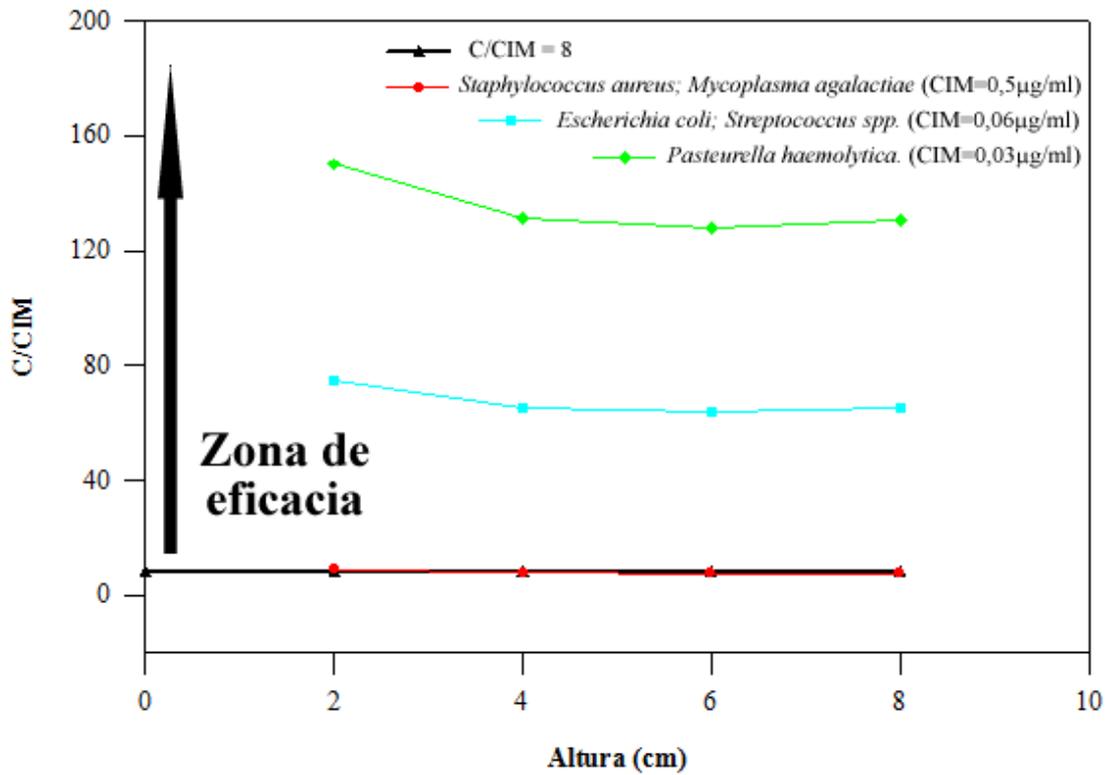


**Figura 72.** Curva media de enrofloxacin en tejido mamario perfundido a las distintas alturas de muestreo, tras la administración *sistémica* de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida, teniendo en cuenta los valores de CIM para los microorganismos utilizados como referencia: CIM = 0,5 µg/ml (*Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma agalactiae*); CIM = 0,06 µg/ml (*Escherichia coli* y *Streptococcus spp*) y CIM = 0,03 µg/ml (*Pasteurella haemolytica*).

**Tabla 35.** Concentración media de enrofloxacino en tejido mamario contralateral no perfundido a las distintas alturas de muestreo, tras la administración *sistémica* de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida (n=12).

Altura (cm)	Concentración de enrofloxacino (C) (µg/g)	Microorganismos (sensibilidad)	CIM (µg/ml)	C/CIM		
2	4,50	menos sensibles +   <i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1	4,50 (a)		
			0,5	9,00		
		sensibles ++	0,125	36,00		
		mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp.</i>		0,06	75,00
			<i>Pasteurella haemolytica</i>		0,03	150,00
				0,008	562,50	
4	3,93	menos sensibles +   <i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1	3,93 (a)		
			0,5	7,86 (a)		
		sensibles ++	0,125	31,44		
		mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp.</i>		0,06	65,50
			<i>Pasteurella haemolytica</i>		0,03	131,00
				0,008	491,25	
6	3,84	menos sensibles +   <i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1	3,84 (a)		
			0,5	7,68 (a)		
		sensibles ++	0,125	30,72		
		mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp.</i>		0,06	64,00
			<i>Pasteurella haemolytica</i>		0,03	128,00
				0,008	480,00	
8	3,91	menos sensibles +   <i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1	3,91 (a)		
			0,5	7,82 (a)		
		sensibles ++	0,125	31,28		
		mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp.</i>		0,06	65,17
			<i>Pasteurella haemolytica</i>		0,03	130,33
				0,008	488,75	

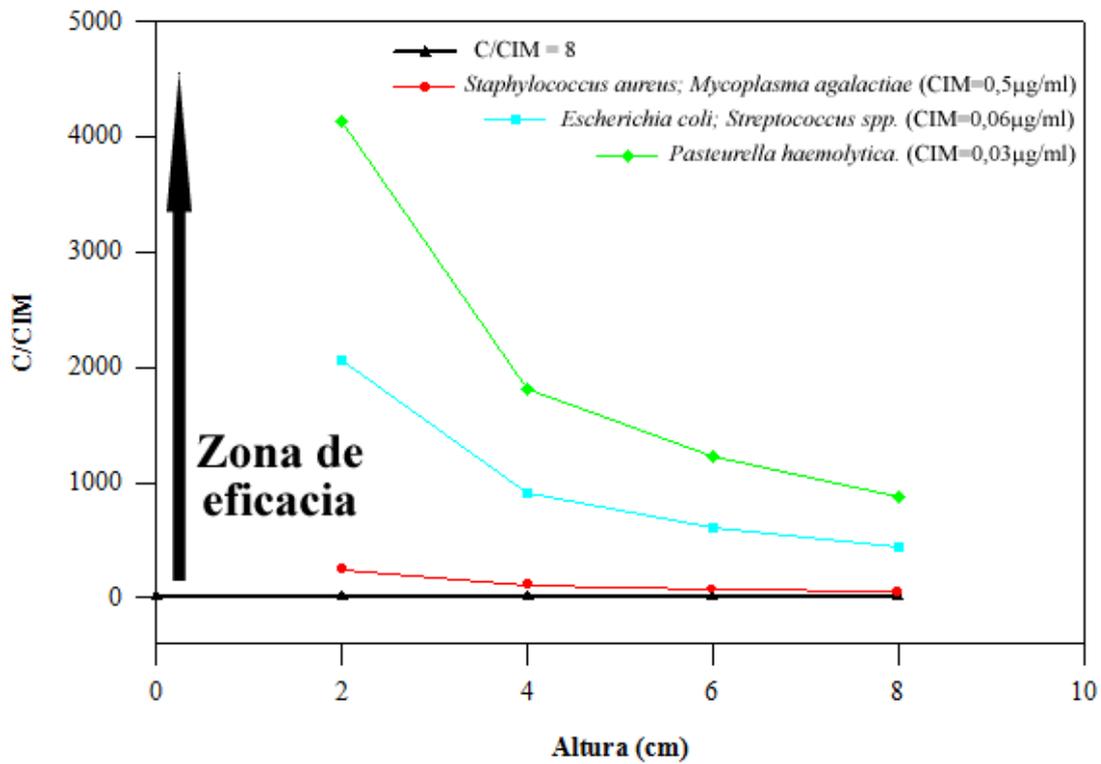
CIM = 0,5 µg/ml (*Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma agalactiae*); CIM = 0,06 µg/ml (*Escherichia coli* y *Streptococcus spp*) y CIM = 0,03 µg/ml (*Pasteurella haemolytica*). (a) = Falta de eficacia: no se supera el límite inferior para el cociente C/CIM  $\geq$  8.



**Figura 73.** Curva media de enrofloxacino en tejido mamario contralateral no perfundido a las distintas alturas de muestreo, tras la administración *sistémica* de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida, teniendo en cuenta los valores de CIM para los microorganismos utilizados como referencia: CIM = 0,5 µg/ml (*Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma agalactiae*); CIM = 0,06 µg/ml (*Escherichia coli* y *Streptococcus spp*) y CIM = 0,03 µg/ml (*Pasteurella haemolytica*).

**Tabla 36.** Concentración media de enrofloxacino en tejido mamario perfundido a las distintas alturas de muestreo, tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida (n=14).

Altura (cm)	Concentración de enrofloxacino (C) (µg/g)	Microorganismos (sensibilidad)	CIM (µg/ml)	C/CIM	
2	123,80	menos sensibles +   <i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1	123,80	
			0,5	247,60	
		sensibles ++		0,125	990,40
			<i>Escherichia coli; Streptococcus spp.</i>	0,06	2063,33
		mas sensibles +++	<i>Pasteurella haemolytica</i>	0,03	4126,67
				0,008	15475,00
4	54,48	menos sensibles +   <i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1	54,48	
			0,5	108,96	
		sensibles ++		0,125	435,84
			<i>Escherichia coli; Streptococcus spp.</i>	0,06	908,00
		mas sensibles +++	<i>Pasteurella haemolytica</i>	0,03	1816,00
				0,008	6810,00
6	36,72	menos sensibles +   <i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1	36,72	
			0,5	73,44	
		sensibles ++		0,125	293,76
			<i>Escherichia coli; Streptococcus spp.</i>	0,06	612,00
		mas sensibles +++	<i>Pasteurella haemolytica</i>	0,03	1224,00
				0,008	4590,00
8	26,42	menos sensibles +   <i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1	26,42	
			0,5	52,84	
		sensibles ++		0,125	211,36
			<i>Escherichia coli; Streptococcus spp.</i>	0,06	440,33
		mas sensibles +++	<i>Pasteurella haemolytica</i>	0,03	880,67
				0,008	3302,50



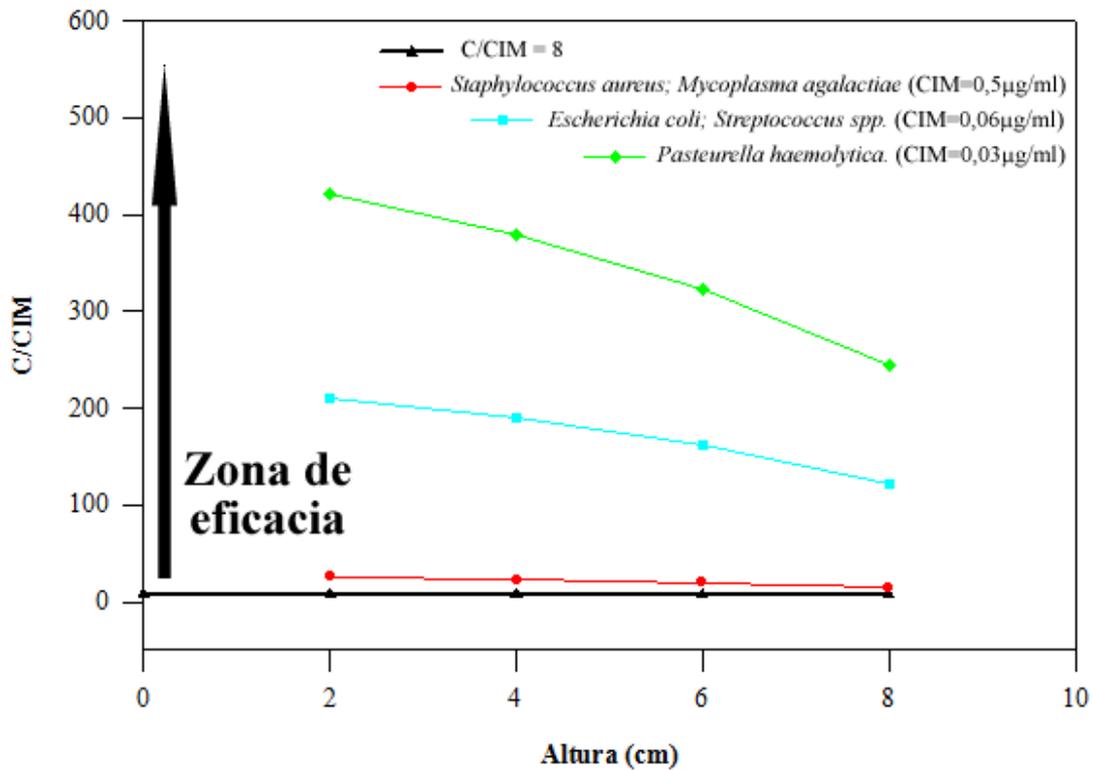
**Figura 74.** Curva media de enrofloxacino en tejido mamario perfundido a las distintas alturas de muestreo, tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida, teniendo en cuenta los valores de CIM para los microorganismos utilizados como referencia: CIM = 0,5 µg/ml (*Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma agalactiae*); CIM = 0,06 µg/ml (*Escherichia coli* y *Streptococcus spp.*) y CIM = 0,03 µg/ml (*Pasteurella haemolytica*).

**Tabla 37.** Concentración media de enrofloxacino en tejido mamario contralateral no perfundido a las distintas alturas de muestreo, tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida (n=14).

Altura (cm)	Concentración de enrofloxacino (C) (µg/g)	Microorganismos (sensibilidad)	CIM (µg/ml)	C/CIM
2	12,62	menos sensibles +   <i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1 0,5	12,62 25,24
		sensibles ++	0,125	100,96
		mas sensibles +++	0,06 0,03 0,008	210,33 420,67 1577,50
		menos sensibles +   <i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1 0,5	11,38 22,76
		sensibles ++	0,125	91,04
		mas sensibles +++	0,06 0,03 0,008	189,67 379,33 1422,50
4	11,38	menos sensibles +   <i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1 0,5	9,69 19,38
		sensibles ++	0,125	77,52
		mas sensibles +++	0,06 0,03 0,008	161,50 323,00 1211,25
		menos sensibles +   <i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1 0,5	7,31 14,62
		sensibles ++	0,125	58,48
		mas sensibles +++	0,06 0,03 0,008	121,83 243,67 913,75
6	9,69	menos sensibles +   <i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1 0,5	7,31 14,62
		sensibles ++	0,125	58,48
		mas sensibles +++	0,06 0,03 0,008	121,83 243,67 913,75
		menos sensibles +   <i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1 0,5	7,31 14,62
		sensibles ++	0,125	58,48
		mas sensibles +++	0,06 0,03 0,008	121,83 243,67 913,75
8	7,31	menos sensibles +   <i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1 0,5	7,31 14,62
		sensibles ++	0,125	58,48
		mas sensibles +++	0,06 0,03 0,008	121,83 243,67 913,75
		menos sensibles +   <i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1 0,5	7,31 14,62
		sensibles ++	0,125	58,48
		mas sensibles +++	0,06 0,03 0,008	121,83 243,67 913,75

CIM = 0,5 µg/ml (*Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma agalactiae*); CIM = 0,06 µg/ml (*Escherichia coli* y *Streptococcus* spp) y CIM = 0,03 µg/ml (*Pasteurella haemolytica*). (a) = Falta de eficacia: no se supera el límite inferior para el cociente

C/CIM ≥ 8.



**Figura 75.** Curva media de enrofloxacino en tejido mamario contralateral no perfundido a las distintas alturas de muestreo, tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en el modelo de ubre perfundida, teniendo en cuenta los valores de CIM para los microorganismos utilizados como referencia: CIM = 0,5 µg/ml (*Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma agalactiae*); CIM = 0,06 µg/ml (*Escherichia coli* y *Streptococcus spp*) y CIM = 0,03 µg/ml (*Pasteurella haemolytica*).

Puede observarse que, tanto tras la administración *sistémica* como intramamaria, se superan las CIMs ( $C/CIM > 8$ ) de los microorganismos patógenos causantes de mastitis en el ganado ovino. Las concentraciones de enrofloxacino alcanzadas a los 180 min de la administración son eficaces incluso frente a aquellos microorganismos menos sensibles cuya CIM es igual a 0,5 µg/ml.

En el caso particular de la administración *sistémica* en el modelo *in vitro* se procedió a la recogida de *pseudo-leche*, calculando posteriormente el cociente entre la concentración a los 180 min y la CIM para los microorganismos patógenos más importantes causantes de mastitis en la especie ovina (tabla 38).

Los resultados obtenidos muestran concentraciones de enrofloxacino en *pseudo-leche* eficaces en todos los casos frente a microorganismos cuyo CIM es igual a 0,03 µg/ml, es decir frente a *Pasteurella haemolytica*. En el caso de aquellos microorganismos con una CIM igual a 0,06 µg/ml (*Escherichia coli* y *Streptococcus* spp.) el cociente C/CIM obtenido para cada una de las ovejas muestreadas fue de 12,12; 20,20; 21,55; 5; 9,62; 8,63 y 6,78. Puede observarse que el enrofloxacino muestra eficacia frente a *Escherichia coli* y *Streptococcus* spp. en 5 de los 7 animales. Finalmente, y para microorganismos cuyo CIM es igual a 0,5 µg/ml (*Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma agalactiae*) no se observó eficacia en ninguno de los casos.

Los estudios llevados a cabo en ovejas vivas, muestran que tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)), las concentraciones medias de enrofloxacino alcanzadas en plasma son inferiores a las alcanzadas en solución Tyrode en el modelo *in vitro* de ubre perfundida. Dichas concentraciones superan las CIMs ( $C/CIM > 8$ ) de *Pasteurella haemolytica*, sin embargo no son eficaces frente a *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma agalactiae*, *Escherichia coli* y *Streptococcus* spp (tabla 39). Debe tenerse en cuenta la gran variabilidad individual que existe en este grupo en cuanto a la concentración de enrofloxacino encontrada en plasma a los distintos tiempos de muestreo (tabla 30).

**Tabla 38.** Eficacia antibacteriana del enrofloxacino en *pseudo-leche* tras la administración *sistémica* de 5 mg/kg en el modelo de ubre perfundida (180 min de perfusión).

Ovejas	Concentración de enrofloxacino (C) (µg/ml)	Microorganismos (sensibilidad)	CIM (µg/ml)	C/CIM		
1	0,727	menos sensibles +	<i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1	0,73	(a)
				0,5	1,45	(a)
		sensibles ++		0,125	5,82	(a)
		mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp. Pasteurella haemolytica</i>	0,06	12,12	(a)
				0,03	24,23	
				0,008	90,88	
2	1,212	menos sensibles +	<i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1	1,21	(a)
				0,5	2,42	(a)
		sensibles ++		0,125	9,70	
		mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp. Pasteurella haemolytica</i>	0,06	20,20	
				0,03	40,40	
				0,008	151,50	
3	1,293	menos sensibles +	<i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1	1,29	(a)
				0,5	2,59	(a)
		sensibles ++		0,125	10,34	
		mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp. Pasteurella haemolytica</i>	0,06	21,55	
				0,03	43,10	
				0,008	161,63	
4	0,300	menos sensibles +	<i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1	0,30	
				0,5	0,60	(a)
		sensibles ++		0,125	2,40	(a)
		mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp. Pasteurella haemolytica</i>	0,06	5,00	(a)
				0,03	10,00	
				0,008	37,50	
5	0,577	menos sensibles +	<i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1	0,58	(a)
				0,5	1,15	(a)
		sensibles ++		0,125	4,62	(a)
		mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp. Pasteurella haemolytica</i>	0,06	9,62	
				0,03	19,23	
				0,008	72,13	
6	0,518	menos sensibles +	<i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1	0,52	(a)
				0,5	1,04	(a)
		sensibles ++		0,125	4,14	(a)
		mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp. Pasteurella haemolytica</i>	0,06	8,63	
				0,03	17,27	
				0,008	64,75	
7	0,407	menos sensibles +	<i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1	0,41	(a)
				0,5	0,81	(a)
		sensibles ++		0,125	3,26	(a)
		mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp. Pasteurella haemolytica</i>	0,06	6,78	(a)
				0,03	13,57	
				0,008	50,88	

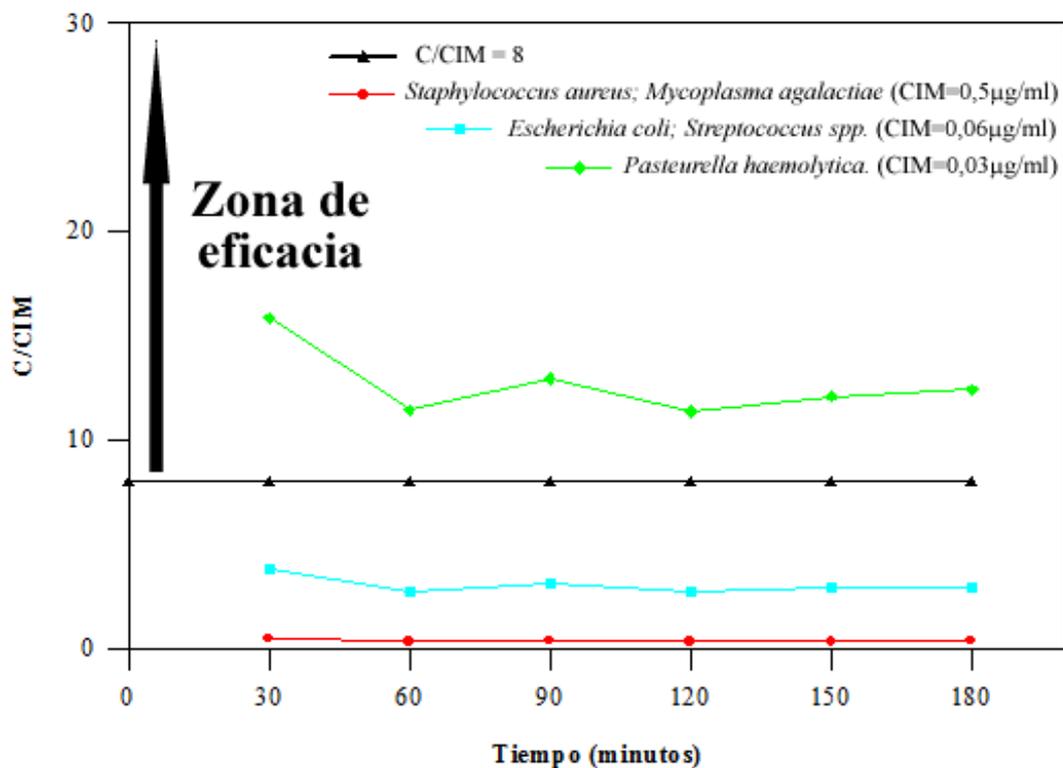
CIM = 0,5 µg/ml (*Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma agalactiae*); CIM = 0,06 µg/ml (*Escherichia coli* y *Streptococcus spp*) y CIM = 0,03 µg/ml (*Pasteurella haemolytica*). (a) = Falta de eficacia: no se supera el límite inferior para el cociente C/CIM  $\geq$  8.

**Tabla 39.** Eficacia antibacteriana del enrofloxacino en plasma tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en animales vivos.

Tiempo (min)	Concentración de enrofloxacino (C) (µg/ml)	Microorganismos (sensibilidad)	CIM (µg/ml)	C/CIM		
30	0,476	menos sensibles +	<i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1	0,48	(a)
				0,5	0,95	(a)
		sensibles ++		0,125	3,81	(a)
				mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp. Pasteurella haemolytica</i>	0,06
		0,03	15,87			
		0,008	59,50			
60	0,343	menos sensibles +	<i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1	0,34	(a)
				0,5	0,69	(a)
		sensibles ++		0,125	2,74	(a)
				mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp. Pasteurella haemolytica</i>	0,06
		0,03	11,43			
		0,008	42,88			
90	0,389	menos sensibles +	<i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1	0,39	(a)
				0,5	0,78	(a)
		sensibles ++		0,125	3,11	(a)
				mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp. Pasteurella haemolytica</i>	0,06
		0,03	12,97			
		0,008	48,63			
120	0,342	menos sensibles +	<i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1	0,34	(a)
				0,5	0,68	(a)
		sensibles ++		0,125	2,74	(a)
				mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp. Pasteurella haemolytica</i>	0,06
		0,03	11,40			
		0,008	42,75			
150	0,363	menos sensibles +	<i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1	0,36	(a)
				0,5	0,73	(a)
		sensibles ++		0,125	2,90	(a)
				mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp. Pasteurella haemolytica</i>	0,06
		0,03	12,10			
		0,008	45,38			
180	0,373	menos sensibles +	<i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1	0,37	(a)
				0,5	0,75	(a)
		sensibles ++		0,125	2,98	(a)
				mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp. Pasteurella haemolytica</i>	0,06
		0,03	12,43			
		0,008	46,63			

CIM = 0,5 µg/ml (*Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma agalactiae*); CIM = 0,06 µg/ml (*Escherichia coli* y *Streptococcus spp.*) y CIM = 0,03 µg/ml (*Pasteurella haemolytica*). (a) = Falta de eficacia: no se supera el límite inferior para el cociente C/CIM  $\geq$  8.

Por su parte, en la figura 76 se observa la representación gráfica de la eficacia del enrofloxacin en plasma, tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacin (5 g de pomada al 20% (m/m)) en ovejas vivas, teniendo en cuenta los valores de CIM para los microorganismos a los que nos venimos refiriendo: CIM = 0,5 µg/ml (*Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma agalactiae*); CIM = 0,06 µg/ml (*Escherichia coli* y *Streptococcus* spp) y CIM = 0,03 µg/ml (*Pasteurella haemolytica*).



**Figura 76.** Eficacia antibacteriana del enrofloxacin en plasma tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacin (5 g de pomada al 20% (m/m)) en ovejas vivas.

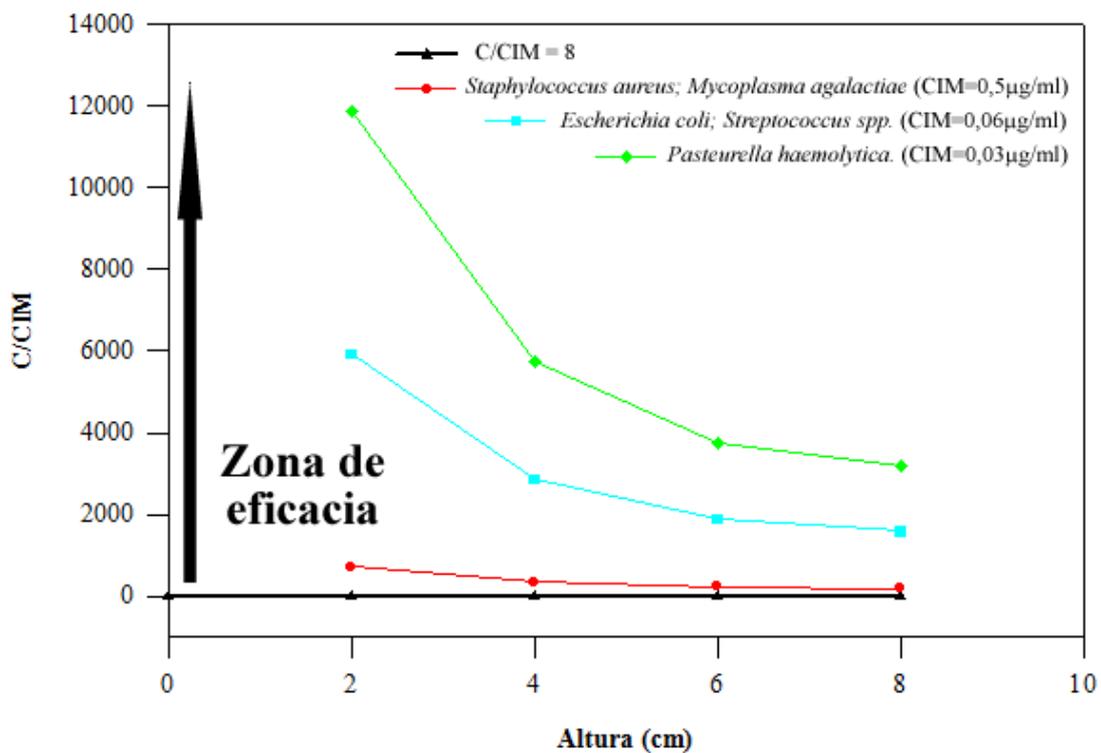
Con lo que respecta a las concentraciones medias de enrofloxacin obtenidas en tejido mamario tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacin (5 g de pomada al 20% (m/m)) en ovejas vivas, se puede observar que son superiores a las obtenidas en el mismo tejido en el modelo *in vitro*. En todos los puntos de

muestreo se alcanzan concentraciones superiores a las CIMs ( $C/CIM > 8$ ) de los microorganismos patógenos causantes de mastitis en el ganado ovino (tabla 40).

**Tabla 40.** Concentración de enrofloxacino en tejido mamario a las distintas alturas de muestreo tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en animales vivos (n=6).

Altura (cm)	Concentración de enrofloxacino (C) ( $\mu\text{g/g}$ )	Microorganismos (sensibilidad)	CIM ( $\mu\text{g/ml}$ )	C/CIM	
2	356,61	menos sensibles +   <i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1	356,61	
			0,5	713,22	
		sensibles ++	0,125	2852,88	
		mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp.</i> <i>Pasteurella haemolytica</i>	0,06	5943,50
				0,03	11887,00
				0,008	44576,25
4	172,34	menos sensibles +   <i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1	172,34	
			0,5	344,68	
		sensibles ++	0,125	1378,72	
		mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp.</i> <i>Pasteurella haemolytica</i>	0,06	2872,33
				0,03	5744,67
				0,008	21542,50
6	113,06	menos sensibles +   <i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1	113,06	
			0,5	226,12	
		sensibles ++	0,125	904,48	
		mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp.</i> <i>Pasteurella haemolytica</i>	0,06	1884,33
				0,03	3768,67
				0,008	14132,50
8	95,60	menos sensibles +   <i>Staphylococcus aureus; Mycoplasma agalactiae</i>	1	95,60	
			0,5	191,20	
		sensibles ++	0,125	764,80	
		mas sensibles +++	<i>Escherichia coli; Streptococcus spp.</i> <i>Pasteurella haemolytica</i>	0,06	1593,33
				0,03	3186,67
				0,008	11950,00

La figura 77 muestra la curva media de concentración de enrofloxacino en tejido mamario a las distintas alturas de muestreo tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) en ovejas vivas, teniendo en cuenta los valores de CIM para los microorganismos utilizados como referencia: CIM = 0,5 µg/ml (*Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma agalactiae*); CIM = 0,06 µg/ml (*Escherichia coli* y *Streptococcus* spp) y CIM = 0,03 µg/ml (*Pasteurella haemolytica*).



**Figura 77.** Curva media de concentración de enrofloxacino en tejido mamario a las distintas alturas de muestreo tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino (5 g de pomada al 20% (m/m)) a 6 ovejas vivas, teniendo en cuenta los valores de CIM para los microorganismos utilizados como referencia: CIM = 0,5 µg/ml (*Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma agalactiae*); CIM = 0,06 µg/ml (*Escherichia coli* y *Streptococcus* spp) y CIM = 0,03 µg/ml (*Pasteurella haemolytica*).

Finalmente y a modo de resumen, señalar que las concentraciones de enrofloxacino alcanzadas en solución Tyrode tras la administración *sistémica* en el modelo *in vitro* de ubre ovina perfundida son mayores a las alcanzadas tras la administración intramamaria en este mismo modelo. En ambos casos las concentraciones alcanzadas son eficaces frente a microorganismos con una CIM = 0,06 µg/ml (*Escherichia coli*, *Streptococcus* spp.) y una CIM = 0,03 µg/ml (*Pasteurella haemolytica*). Sin embargo, no son eficaces frente a microorganismos cuya CIM = 0,5 µg/ml (*Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma agalactiae*).

En el caso de ovejas vivas y tras la administración intramamaria, las concentraciones de enrofloxacino alcanzadas en plasma son menores a las alcanzadas en solución Tyrode en el modelo *in vitro*. Reduciéndose la eficacia del antibacteriano a microorganismos con una CIM = 0,03 µg/ml (*Pasteurella haemolytica*).

Por su parte, los resultados obtenidos en *pseudo-leche* tras la administración *sistémica* en el modelo *in vitro* muestran, al igual que los obtenidos en solución Tyrode tras la administración *sistémica* e intramamaria, concentraciones eficaces frente a *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp. (CIM = 0,06 µg/ml) y *Pasteurella haemolytica* (CIM = 0,03 µg/ml), pero no frente a *Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma agalactiae* (CIM = 0,5 µg/ml).

En el caso del tejido mamario las concentraciones alcanzadas, tanto tras la administración *sistémica* como intramamaria en el modelo *in vitro*, son eficaces frente a los microorganismos patógenos causantes de mastitis a los cuales nos venimos refiriendo. Señalar que las concentraciones alcanzadas en el primer punto de muestreo (2 cm) tras la administración intramamaria son marcadamente superiores a las alcanzadas tras la administración *sistémica*. Sin embargo en el resto de puntos de muestreo (4, 6 y 8 cm) las concentraciones son similares.

Las concentraciones de enrofloxacino obtenidas en tejido mamario en ovejas vivas tras la administración intramamaria, son eficaces asimismo frente a los microorganismos patógenos causantes de mastitis: *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma agalactiae* (CIM = 0,5 µg/ml); *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp. (0,06 µg/ml) y *Pasteurella haemolytica* (CIM = 0,03 µg/ml). Dichas concentraciones

resultaron ser 2,693 veces superiores a las alcanzadas en el mismo tejido tras la administración intramamaria en el modelo *in vitro*. Observándose una buena correlación entre los resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro*.

Por último, señalar que aunque los resultados obtenidos para la solución Tyrode y *pseudo-leche*, tanto tras la administración *sistémica* como intramamaria, en el modelo *in vitro*, y los obtenidos en plasma tras la administración intramamaria en ovejas vivas, mostraban una escasa o nula eficacia frente a *Staphylococcus aureus* (CIM = 0,5 µg/ml) los resultados obtenidos en tejido señalan una clara eficacia frente a éste microorganismo causante de infecciones profundas en el tejido mamario (mastitis gangrenosas) del ganado ovino (Sandholm *et al.*, 1990).

Se puede deducir que, como ya afirmaron en su momento otros autores, los estudios llevados a cabo *in vivo* para determinar la disposición local de un antibacteriano realizados mediante el muestreo de sangre y leche, no son suficientes para estimar la concentración de antibacteriano en el órgano diana (glándula mamaria) y por lo tanto para estimar la eficacia antibacteriana del mismo. (Rollins *et al.*, 1970; Kietzmann *et al.*, 1993; Ehinger y Kietzmann, 2000a y b; Bäumer y Kietzmann, 2001; Ehinger *et al.*, 2006). Es por esta razón, que los modelos *in vitro* de ubre perfundida cobran importancia a la hora de determinar la concentración de antibacteriano que llega a la glándula mamaria, completando así los estudios farmacocinéticos convencionales sobre la distribución tisular de los antibacterianos.

## ***CONCLUSIONES***



1. El modelo de ubre ovina perfundida utilizado en el presente estudio resultó ser viable al encontrarse que los valores de los parámetros bioquímicos (glucosa y lactato) y del pH estuvieron dentro de los valores fisiológicos normales a lo largo de todo el periodo de perfusión. Así mismo, los resultados obtenidos en el estudio histológico junto con la valoración macroscópica realizada, también confirmaron la viabilidad de este modelo.
2. El modelo que mejor describe la cinética del enrofloxacino en solución Tyrode tras la administración *sistémica* (dosis media de 250 mg) en el modelo *in vitro* de ubre ovina perfundida es el monocompartimental abierto. Sin embargo, los principales parámetros farmacocinéticos determinados no mostraron diferencias significativas con los obtenidos utilizando la metodología no compartimental.
3. Tras esta misma administración, los niveles de fármaco observados en tejido mamario mostraron una distribución uniforme tanto en la glándula mamaria perfundida como en la contralateral no perfundida, aunque en esta última, las concentraciones de enrofloxacino fueron aproximadamente diez veces menores.
4. Las concentraciones de enrofloxacino determinadas en solución Tyrode tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino en el modelo *in vitro* fueron más bajas que las obtenidas tras la administración *sistémica*, alcanzándose el máximo entre los 150 y 180 minutos en todos los animales.
5. Utilizando esta misma vía de administración, los niveles de enrofloxacino en tejido mamario no fueron uniformes sino que descendieron exponencialmente con la distancia al lugar de aplicación. Por otra parte, las concentraciones alcanzadas fueron mucho más altas que las obtenidas tras la administración *sistémica* en la biopsia tomada a los 2 cm, ligeramente superiores a los 4 cm y ligeramente inferiores a los 6 y 8 cm.
6. En el caso de ovejas vivas y tras la administración intramamaria de 1 g de enrofloxacino, las concentraciones alcanzadas en plasma fueron menores que las obtenidas en solución Tyrode en el modelo *in vitro*, manteniéndose en niveles muy similares durante todo el tiempo de muestreo (180 minutos).

7. Las concentraciones de enrofloxacino encontradas en tejido mamario en ovejas vivas tras la administración intramamaria fueron mayores que las obtenidas en el modelo *in vitro* en todos los puntos de muestreo. Por otro lado, se encontró una relación exponencial decreciente entre la concentración y la altura, similar a la descrita para el modelo *in vitro*. Estas relaciones nos permiten establecer que las concentraciones alcanzadas *in vivo* son 2,7 veces más altas que las obtenidas *in vitro*.
8. Tras la administración intramamaria, tanto en el modelo *in vitro* como en ovejas vivas se alcanzaron en tejido mamario concentraciones eficaces (relación  $C_{\max}/CIM > 8$ ) frente a los microorganismos patógenos que con mayor frecuencia causan mastitis en el ganado ovino: *Pasteurella haemolytica*, *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma agalactiae* al final del periodo de muestreo (180 minutos) y a las dosis propuestas.
9. El modelo *in vitro* propuesto en esta memoria se postula como una alternativa adecuada al empleo de animales vivos en los estudios de eficacia y seguridad de antimicrobianos de aplicación intramamaria formulados en vehículos con distinta capacidad de difusión tisular.

# ***BIBLIOGRAFÍA***



- Aarestrup FM, Jorsal SE, Jensen NE. Serological characterization and microbiological susceptibility of *Streptococcus suis* isolates from diagnostic samples in Denmark during 1995 and 1996. *Vet Microbiol* 1998;60:59-66.
- Abd-el Aziz MI, Aziz MA, Soliman FA, Afify NA. Pharmacokinetic evaluation of enrofloxacin in chicken. *Br Poultry Sci* 1997;38:164-8.
- Albarellos GA, Kreil VE, Landoni MF. Pharmacokinetics of ciprofloxacin after single intravenous and repeated oral administration to cats. *J Vet Pharmacol Therapap* 2004;27:155-62.
- Alovero FL, Pan X, Morris JE, Manzo RH, Fisher LM. Engineering the specificity of antibacterial fluoroquinolones: benzenesulfonamide modifications at C-7 of ciprofloxacin change its primary target in *Streptococcus pneumoniae* from topoisomerase IV to gyrase. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:320-5.
- Allemandi DA, Alovero FL, Manzo RH. In vitro activity of new sulphanilil fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1994;34:261-5.
- Allen A, Bygate E, Clark D, Lewis A, Pay V. The effect of food on the bioavailability of oral gemifloxacin in healthy volunteers. *Int J Antimicrob Agents* 2000;16:45-50.

## Bibliografía

- Ambros L, Montoya L, Kreil V, Waxman Dova S, Albarellos G, Rebuelto M et al. Farmacocinética de la enrofloxacin y su metabolito ciprofloxacina en cabras (poster communication). Proceeding of the 30<sup>th</sup> Congress of Argentine Animal Production. Argentina, 2007;329-30.
- Amer AMM, Hassan AB, Moustafa MI. Pharmacokinetics, bioavailability and milk concentrations of enrofloxacin in lactating goats. Proceeding of the 8<sup>th</sup> International Congress of the EAVPT. Israel, 2000;6.
- Aminimanizani A, Beringer P, Jelliffe R. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of the newer fluoroquinolone antibacterial. Clin Pharmacokinet 2001;40:169-87.
- Anadón A, Martínez Larrañaga MR, Velez C, Diaz MJ, Bringas P. Pharmacokinetics of norfloxacin and norfloxacin and its N-desethyl and oxo metabolites in broiler chickens. Am J of Vet Res 1992;53:2084-9.
- Anadón A, Martínez Larrañaga MR, Díaz MJ, Bringas P, Martínez MA, Fernandez Cruz ML et al. Pharmacokinetics and residues of enrofloxacin in chicken. Am J of Vet Res 1995;56:501-6.
- Anadón A, Martínez Larrañaga MR, Díaz MJ, Fernandez Cruz ML, Martinez MA, Frejo MT et al. Pharmacokinetics variables and tissue residues of enrofloxacin and ciprofloxacina in healthy pigs. Am J Vet Res 1999;60:1377-82.
- Andersson MI, MacGowan AP. Development of the quinolones. J Antimicrob Chemother 2003;51:1-11.
- Anderson VE, Gootz TD, Osheroff N. Topoisomerase IV catalysis and the mechanism of quinolone action. J Biol Chem 1998;273:17879-85.
- Anduriz J, Escobal I, Salazar LM, Contreras A, Marco JC. Efficacy of enrofloxacin during the lactation against mastitis caused by *Mycoplasma bovis* in dairy cattle. Proceeding of the 9<sup>th</sup> World Buiatrics Congress. Edinburgh, 1996.

- Anne E, Asuquo J, Piddock V. Accumulation and killin kinetics of fifteen quinolones for *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 1993;31:865-80.
- Appelbaum PC, Hunter PA. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. Int J Antimicrob Agents 2000;16:5-15.
- Appelbaum PC, Pankuch GA, Bozdogan B, Lin G, Jacobs MR, Patel MV et al. Activity of the new quinolone WCK 771 against pneumococci. Clin Microbiol Infect 2005;11:9-14.
- Aramayona JJ, García MA, Fraile L, Abadía AR, Bregante MA. Placental transfer of enrofloxacin in rabbits. Am J of Vet Res 1994;55:1313-8.
- Aramayona JJ, Mora J, Fraile LJ, García MA, Abadía AR; Bregante MA. Penetration of enrofloxacin and ciprofloxacin into breast milk, and pharmacokinetics of the drugs in lactating rabbits and neonatal offspring. Am J of Vet Res 1996; 57:547-53.
- Ayadi M, Caja G, Such S, Ghirardi JJ. Efecto del nivel de alimentación antes de la pubertad en la fertilidad y la producción de la leche durante la primera lactación de corderas de raza Manchega y Lacaune. In: XXVII Jornadas Científicas de la SEOC. Valencia, 2002;127-35.
- Azanza JR, Sádaba B, Mediavilla A, Flórez J. Quinolonas, Sulfamidas, Trimetoprima, Cotrimoxazol, Nitrofurantoína, Antisépticos. In: Flórez J (director). Farmacología humana. 4ªed. Barcelona: Masson-Salvat Medicina, 2003. pp.1171-2.
- Ballesta S, Pascual A, García I, Perea JE. Uptake of 5 fluoroquinolones into human polymorphonuclear cells. Enferm Infecc Microbiol Clin 1996;14:470-3.
- Banholzer E, Heinritzi K, Steinhausen G, Scheer M, Pederson Mörner. Pharmacokinetics of enrofloxacin in slaughter pigs following different routes of administration. J Vet Pharmacol Therap 1997;20:48.

## Bibliografía

- Banks WJ. Aparato reproductor del macho y la hembra. In: Banks WJ (autor). Histología veterinaria aplicada. 2ªed. México: El Manual Moderno, 1986. pp.606-57.
- Barbour SD. Effect of nalidixic acid on conjugational transfer and expression of episomal Lac genes in *Escherichia coli* K12. J Mol Biol 1967;27:373-6.
- Bauditz R. Results of clinical studies with Baytril® in calves and pigs. Vet Med Rev 1987a;2:122-9.
- Bauditz R. Results of clinical studies with Baytril® in poultry. Vet Med Rev 1987b;2:130-6.
- Bauernfeind A. Comparison of the antibacterial activities of the quinolones Bay 12-8039, gatifloxacin (AM 1155), trovafloxacin, cinafloxacin, levofloxacin and ciprofloxacin. J Antimicrob Chemother 1997;40:639-51.
- Bäumer W, Kietzmann M. Effects of steroidal and nonsteroidal antiphlogistic drugs on eicosanoid synthesis in irritated skin: studies with the isolated perfused bovine udder. J Pharm Pharmacol 2001;53:743-7.
- Bebear CM, Renaudin H, Charron A, Clerc M, Pereyre S, Bebear C. DNA gyrase and topoisomerase IV mutations in clinical isolated of *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma hominis* resistant to fluoroquinolones. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:3323-5.
- Benet LZ, Galeazzi RL. Noncompartmental determination of steady-state volume distribution. J. Pharm Sci 1979;68:1071-4.
- Bergogne-Berezin E. Clinical role of protein binding of quinolones. Clin Pharmacokinet 2002;41:741-50.
- Bergonier D, De Crémoux R, Rupp R, Lagriffoul G, Berthelot X. Mastitis of dairy small ruminants. Vet Res 2003a;34:689-716.

- Bergonier D, Berthelot X. New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. *Livestock Production Science* 2003b;79:1-16.
- Bermingham EC, Papich MG, Vivrette S. Pharmacokinetics of enrofloxacin after oral and IV administration to foals. *Am J of Vet Res* 2000;61:706-9.
- Bermingham EC, Papich MG. Pharmacokinetics after intravenous and oral administration of enrofloxacin in sheep. *Am J of Vet Res* 2002;63:1012-7.
- Bertino JJ, Fish D. The safety profile of the fluoroquinolones. *Clin Ther* 2000;22:798-817.
- Bidgood T, Papich MG. Plasma and interstitial fluid pharmacokinetics of enrofloxacin, its metabolite ciprofloxacin, and marbofloxacin after oral administration and a constant rate intravenous infusion in dogs. *J Vet Pharmacol Therap* 2005;28:329-41.
- Blondeau JM. Expanded activity and utility of the new fluoroquinolones: a review. *Clin Ther* 1999;21:3-40.
- Bocquier F, Guillouet PH. Nutrition et alimentation de la brebis laitière. In: Seminario avanzado sobre mejora de la calidad en la producción del ovino de leche. Zaragoza: CIHEAM-IAMZ, 1990. pp.38.
- Boothe DM, Boeckh A, Boothe HW, Wilkie S, Jones S. Plasma concentration of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in dogs following single oral administration of enrofloxacin at 7,5; 10 or 20 mg/kg. *Vet Ther* 2002;3:409-19.
- Böttner A, Schmid P, Hume R. In vitro efficacy of cefquinone (INN) and other anti-infective drugs against bovine bacterial isolates from Belgium, France, Germany, The Netherlands, and the United Kingdom. *J Vet Med* 1995;42:377-83.
- Bregante MA, Saez P, Aramayona JJ, Fraile L, García MA, Solans C. Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin in mice, rats, rabbits, sheep and cows. *Am J of Vet Res* 1999;60:1111-6.

## *Bibliografía*

- Breitschwerdt EB, Davidson MG, Aucoin DP, Levy MG, Szabados NS, Hegarty BC et al. Efficacy of chloramphenicol, enrofloxacin, and tetracycline for treatment of experimental Rocky Mountain spotted fever in dogs. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:2375-81.
- Brighty KE, Gootz TD. The chemistry and biological profile of trovafloxacin. *J Antimicrob Chemother* 1997;39:1-14.
- Broome RL, Brooks DL. Efficacy of enrofloxacin in the treatment of respiratory pasteurellosis in rabbits. *Laboratory Animals Science* 1991a;41:572-6.
- Broome RL, Brooks DL, Babish JG, Copeland DD, Gonzelman GM. Pharmacokinetic properties of enrofloxacin in rabbits. *Am J of Vet Res* 1991b;52:1835-41.
- Browne FA, Bozdogan B, Clark C, Kelly LM, Ednie L, Kosowska K et al. Antipneumococcal activity of DK-507, a new quinolone, compared with the activities of 10 other agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3815-24.
- Brown SA. Fluoroquinolones in animal health. *J Vet Pharmacol Therap* 1996;19:1-14.
- Bugyei K, Black WD, McEwen S. Pharmacokinetics of enrofloxacin given by the oral, intravenous and intramuscular routes in broiler chicken. *Can J Vet Res* 1999;63:193-200.
- Butaye P, Ducatelle R, De Backer P, Vermeersch H, Remon J, Haesebrouck F. In vitro activities of doxycycline and enrofloxacin against European *Chlamydia psittaci* from turkeys. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:2800-1.
- Cabanes A, Arboix M, Anton JMA, Reig F. Pharmacokinetics of enrofloxacin after intravenous and intramuscular injection in rabbits. *Am J of Vet Res* 1992;53:2090-3.

- Caja G, Such X, Rovai M. Udder morphology and machine milking ability in dairy sheep. Proceeding of the 6<sup>th</sup> Great Lakes Dairy Sheep Symposium. Canadá, 2000;17-40.
- Cantón E, Gobernado M, Jiménez T, Izquierdo R. Lomefloxacin: laboratory study of antibacterial activity. *Rev Esp Quimioterap* 1989;2:237-44.
- Capuco A, Smith J, Waldo D, Rexroad C. Influence of prepuberal dietary regimen on mammary growth of Holstein heifers. *J Dairy Sci* 1995;78:2709-25.
- Caputo JF, Brown SA, Papich MG. Pharmacokinetics of premafloxacin following single intravenous, oral solution or oral capsule dose to healthy Beagle dogs. *J Vet Pharmacol Therap* 1997;20:60-1.
- Calhoun ML, Stinson W. Tegumento. In: Dellmann HD, Brown EM (autores). *Histología Veterinaria*. Zaragoza: Acribia, 1980. pp.507-12.
- Carlotti DN, Guaguere E, Pin D, Jasmin P, Thomas E, Guiral V. Therapy of difficult cases of canine pyoderma with marbofloxacin: a report of 39 cases. *J Small Anim Pract* 1999;40:265-70.
- Carlucci G. Review analysis of fluoroquinolones in biological fluids by High Performance Liquid Chromatography. *J Chrom* 1998;812:343-67.
- Catarsini O, Balbo SM, Pugliese A, Prato F. Experiences with Baytril<sup>®</sup> in sheep. *Vet Med Rev* 1995;61:10-2.
- Cester CC, Schneider M, Toutain PL. Comparative kinetics of two orally administered fluoroquinolones in dog: Enrofloxacin versus marbofloxacin. *Vet Med Rev* 1996;147:703-16.
- Cester CC, Toutain PL. A comprehensive model for enrofloxacin to ciprofloxacin transformation and disposition in dog. *J Pharmaceut Sci* 1997;86:1148-55.
- Chapmann JS, Georgopapadakou NH. Routes of quinolone permeation in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32:438-42.

## *Bibliografía*

- Chen CR, Malik M, Snyder M, Drlica K. DNA gyrase and topoisomerase IV on the bacterial chromosome: quinolone-induced DNA cleavage. *J Mol Biol* 1996;258:627-37.
- Chu DT, Fernandez PB. Structure-activity relationships of the fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:131-5.
- Climent S, Sarasa M, Muniesa P, Latorre R. Manual de anatomía y embriología de los animales domésticos. Zaragoza: Acribia, 2005. pp.403-19.
- Cohen SP, McMurry LM, Hooper DC, Wolfson JS, Levy SB. Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple-antibiotic-resistant (Mar) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: Decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition of OmpF reduction. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:1318-25.
- Conzelman GM, Babish JG, Davidson JN, McMillan RA, Copeland DD. Pharmacokinetics of 1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(4-ethyl-1-piperazinyl)-3-quinolone-carboxylic acid (Bay Vp 2674) in chickens. *Proc West Pharmacol Soc* 1987;30:393-5.
- Cotard JP, Gruet P, Pechereau D, Moreau P, Pages JP, Thomas E et al. Comparative study of marbofloxacin and amoxicillin-clavulanic acid in the treatment of urinary tract infections in dogs. *J Small Anim Pract* 1995;36:349-53.
- Craig W, Vogelmann B. The postantibiotic effect. *Am Intern Med* 1987;106:900-2.
- Craig W. Pharmacodynamics of antimicrobial agents as a basis for determining dosage regimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:6-8.
- Craig W, Dalhoff A. Pharmacodynamics of fluoroquinolones in experimental animals. In: Born GVR, Cuatrecas P, Ganten D, Herken H, Melmon KL, Starke K (eds). *Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin: Springer, 1998a. pp. 208-32.

- Craig W. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* 1998b;26:1-10.
- Crumplin GC, Smith JT. Nalidixic acid: an antibacterial paradox. *Antimicrob Agents Chemother* 1975;8:251-61.
- Crumplin GC, Kenwright M, Hirst T. Investigations into the mechanism of action of antibacterial agent norfloxacin. *J Antimicrob Chemother* 1984;13:9-13.
- Cunningham JG, Klein BG. *Fisiología Veterinaria*. 4ªed. Barcelona: Elsevier, 2009.
- Cutler DJ. Theory of the mean absorption time, an adjunct to conventional bioavailability studies. *J Pharm Sci* 1978;30:476-8.
- Dalsgaard I, Bjerregaard J. Enrofloxacin as an antibiotic in fish. Proceeding of the 5<sup>th</sup> Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology. Copenhagen, 1991;300-2.
- Davidson JN, Conzelman GM, Baggot JD. Pharmacokinetics of 1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4oxo-7-(4-ethyl-1-piperazinyl)-3 quinolone-carboxylic acid (CFPQ) in pre-ruminant and ruminant calves. Proceeding of the Western Pharmacological Society 1986;29:129-32.
- Davis JL, Foster DM, Papich MG. Pharmacokinetics and tissue distribution of enrofloxacin and its active metabolite ciprofloxacin in calves. *J Vet Pharmacol Therap* 2007;30:564-71.
- Delaporte J, Froyman R, Ganiere JP, Florent J. Distribution of enrofloxacin within hatching eggs during drinking water treatment with Baytril® 10% oral solution in breeder turkeys (poster communications). Proceeding of the 7<sup>th</sup> Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology. Session 9: Antimicrobials and Chemotherapeutics. Edinburgh, 1994;235-6.
- Delouis C, Richard P. La lactation. In: Thibault C, Levasseur MC. *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Paris: INRA, 1991. pp.487-514.

## Bibliografía

- Deppermann KM, Lode H. Fluoroquinolones: interaction profile during enteral absorption. *Drugs* 1993;45:65-72.
- De Sarro A, De Sarro G. Adverse reactions to fluoroquinolones. An overview on mechanistic aspects. *Curr Med Chem* 2001;8:371-84.
- Diaz D, Picco EJ, Encinas T, Rubio M, Litterio NJ, Boggio JC. Residuos tisulares de nicotinato de norfloxacin administrado por vía oral en cerdos. *Arch Med Vet* 2001;33:37-42.
- Dietz VH, Cook TM, Gross WA. Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*. III condition required for lethality. *J Bacteriol* 1966;91:768-73.
- Dimitrova DJ, Lashev LD, Yanev SG, Pandova B. Pharmacokinetics of enrofloxacin in turkeys. *Res Vet Sci* 2007;82:392-7.
- Dorfman M, Barsand J, Budsberg SC. Enrofloxacin concentrations in dogs with normal prostate and dogs with chronic bacterial prostatitis. *Am J of Vet Res* 1995;56:386-90.
- Drlica K, Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997;61:377-92.
- Drusano GL, Johnson DE, Rosen M, Standiford HC. Pharmacodynamics of a fluoroquinolone antimicrobial agent in a neutropenic rat model of *Pseudomonas sepsis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:448-90.
- Dudley MN. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of antibiotics with special reference to the fluoroquinolones. *Am J Med* 1991;91:45-50.
- Duval JM, Budsberg SC. Cortical bone concentration of enrofloxacin in dogs. *Am J of Vet Res* 1995;56:188-92.
- Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG. *Anatomía Veterinaria*. 2ªed. México: McGraw-Hill Interamericana, 1999.

- Eagle H, Musselman A. The rate of bactericidal action of penicillin in vitro as a function of its concentration, and its paradoxically reduced activity, at high concentrations against certain organism. *J Exp Med* 1948;88:99-131.
- Efthymiopoulos C, Bramer SL, Maroli A. Effect of food and gastric pH on the bioavailability of grepafloxacin. *Clin Pharmacokinet* 1997;33:18-24.
- Ehinger AM, Kietzmann M. Pharmakokinetische Aspekte der Mastitistherapie. *Berl und Munch Tierarztl Wochenschr* 1998;9:337-43.
- Ehinger AM, Kietzmann M. Tissue distribution of oxacillin and ampicillin in the isolated perfused bovine udder. *J Vet Med* 2000a;47:157-68.
- Ehinger AM, Kietzmann M. Tissue distribution of benzylpenicillin after intramammary administration in the isolated perfused bovine udder. *J Vet Pharmacol Therap* 2000b;23:303-10.
- Ehinger AM, Bäumer W, Zerbe H, Ehinger B, Kietzmann M. Verteilung von intrazisternal appliziertem Benzylpenicillin im Drüsengewebe des Rindereuters: Abhängigkeit vom Gesundheitszustand. *Tierartl Praxis* 2004;32:79-83.
- Ehinger AM, Schmidt H, Kietzmann M. Tissue distribution of cefquinome after intramammary and systemic administration in the isolated perfused bovine udder. *Vet J* 2006;172:147-53.
- Elmas M, Tras B, Kaya S, Bas AL, Yazar E, Yarsan E. Pharmacokinetics of enrofloxacin after intravenous and intramuscular administration in Angora goats. *Can J Vet Res* 2001;65:64-7.
- Elmas M, Yazar E, Bas AL, Tras B, Bayezit M, Yapar K. Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin and tissue concentrations of parent drug and ciprofloxacin after intramuscular administrations of free and liposome-encapsulated enrofloxacin in rabbits. *J Vet Med* 2002;49:507-12.

## *Bibliografía*

- Elmas M, Üney K, Yazar E, Karabacak A, Tras B. Pharmacokinetics of enrofloxacin following intravenous and intramuscular administration in Angora rabbits. *Res Vet Sci* 2007;82:242-5.
- Elsheikh HA, Taha AAW, Khalafallah AI, Osma IAM. Disposition kinetics of enrofloxacin (Baytril® 5%) in sheep and goats following intravenous and intramuscular injection using a microbiological assay. *Res Vet Sci* 2002;73:125-9.
- El-Sooud KA. Influence of albendazol on the disposition kinetics and milk antimicrobial equivalent activity of enrofloxacin in lactating goats. *Pharmacol Res* 2003;48:389-95.
- Emmerson AM, Jones AM. The quinolones: decades of development and use. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:13-20.
- Ensink JM, Van Klinger B, Houwers Dj, Klein WR, Vulto AG. In-vitro susceptibility to antimicrobial drugs of bacterial isolates from horses in The Netherlands. *Equi Vet J* 1993;25:309-13.
- Esnal A, Marco JC, Escobal I, Extramiana AB, Elorriaga M. Etología de las mastitis en el ganado ovino lechero (I): Diferencias en la distribución de los patógenos mamarios en función de su presentación clínica o subclínica. *Tierras CyL* 2008;152:19-23.
- Estribano E, Calpena AC, Garrigues TM, Freixas J, Domenech J, Moreno J. Structure-absorption relationships of a series of 6-fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:1996-2000.
- Fichas técnicas de uso veterinario [base de datos en Internet]. Madrid. Agencia Española del Medicamento [acceso 10 de mayo de 2008]. Disponible en: <http://www.agemed.es>
- Fisher LM, Austin CA, Hopewell R, Margerrison EE, Oram M, Patel M et al. DNA supercoiling and relaxation by ATP-dependent DNA topoisomerases. *Phil Trans Royal Soc Lond Biol Sci* 1992;336:83-91.

- Flammer K, Aucoin DP, Whitt DA. Intramuscular and oral disposition of enrofloxacin in African grey parrots following single and multiple doses. *J Vet Pharmacol Therap* 1991;14:359-66.
- Flammer K. Common bacterial infections and antibiotic use in companion birds. *Compendium on continuing education for the practicing veterinarian* 1998; 20:34-48.
- Forrest A, Nix DE, Ballow CH, Goss TF, Birmingham MC, Schentag JJ. Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:1073-81.
- Frazier DL, Thompson L, Trettien A, Evans EI. Comparison of fluoroquinolone pharmacokinetic parameters after treatment with marbofloxacin, enrofloxacin, and difloxacin in dogs. *J Vet Pharmacol Therap* 2000;23:293-302.
- Froyman R, Scheer m, De Jong A. Serum kinetics of enrofloxacin in Pekin ducks during drinking water medication with Baytril® 10% oral solution (poster communications). *Proceeding of the 7<sup>th</sup> Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology. Session 9: Antimicrobials and Chemotherapeutics. Edinburgh, 1994;236.*
- Fu LX, Jiang ZG, Ding HZ, Liu YH. Population pharmacokinetics of enrofloxacin and its active metabolite ciprofloxacin in ill cows. *J Vet Pharmacol Therap* 2008;31:240-5.
- Funke H. The distribution of 35S-labelled benzylpenicillin in normal and mastitic mammary glands of cows and goats after local and systemic administration. *Acta Vet Scand* 1961;2:1-88.
- Gabrielsson J, Weiner D. *Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data Analysis: Concepts & Applications*. 4<sup>a</sup>ed. Stockholm:Swedish Pharmaceutical Press, 2007.
- Gajjar DA, Sukoneck SC, Bello A, Ge Z, Christopher L, Grasela DM. Effect of a high-fat meal on the pharmacokinetics of the des-F(6)-quinolone BMS-284756. *Pharmacotherapy* 2002;22:160-5.

## *Bibliografía*

- Gallego L, Caja G, Torres A. Estudio de la tipología y características morfológicas de las ubres en ovejas de la raza Manchega desde el parto. Proceeding of the 3<sup>th</sup> International Symposium on Machine Milking of Small Ruminants. Valladolid, 1983;100-16.
- Ganière JP, Pedersen Mørner A, De Jong A, Monlouis JD, Richez P. Tissue distribution of intramuscularly administered enrofloxacin and danofloxacin in pigs. *J Vet Pharmacol Therap* 1997;20:145-6.
- García I, Pascual A, Conejo CM, Perea JE. Intracellular penetration of 5 quinolones into non phagocytic cells. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1996;14:167-70.
- García I, Pascual A, Ballesta S, Joyanes P, Perea JE. Intracellular penetration and activity of gemifloxacin in human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:3193-5.
- García Ovando H, Gorla N, Luders C, Poloni G, Errecalde C, Prieto G et al. Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in chickens. *J Vet Pharmacol Therap* 1999;22:209-12.
- Gargallo-Viola D, Ferrer S, Tudela E, Robert M, Coll R, Roser R et al. Antibacterial activities and pharmacokinetics of E-4767 and E-5065, two new 8-chlorofluoroquinolones with a 7-azetidin ring substituent. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:3113-21.
- Gavrielli R, Yagil R, Ziv G, Creveld CV, Glickman A. Effect of water deprivation on the disposition kinetics of enrofloxacin in camels. *J Vet Pharmacol Therap* 1995;18:333-9.
- Gellert M, Mizuuchi K, O'Dea MH, Nash HA. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73:3872-6.
- Gibaldi M, Perrier D. *Pharmacokinetics*. 2<sup>a</sup>ed. New York: Marcel Dekker, 1982.

- Giguère S, Sweeney RW, Bélanger M. Pharmacokinetics of enrofloxacin in adult horses and concentration of the drug in serum, body fluids, and endometrial tissues after repeated intragastrically administered doses. *Am J of Vet Res* 1996;57:1025-30.
- González-Rodríguez MC, Gonzalo C, San Primitivo F, Cármenes. Relationship between somatic cell count and intramammary infection of the half udder in dairy ewes. *J Dairy Sci* 1995;78:2753-9.
- Gonzalo C, Ariznabarreta A, Carriedo JA. Mammary pathogens and their relationship to somatic cell count and milk yield losses in dairy ewes. *J Dairy Sci* 2002;85:1460-7.
- Gorla N, García Ovando H, Iarripa I. Chromosomal aberrations in human lymphocytes exposed in vitro to enrofloxacin and ciprofloxacin. *Toxicology Letter* 1999;104:43-8.
- Göbel T. Bacterial disease and antimicrobial therapy in small mammals. *Compendium on continuing education for the practicing veterinarian* 1999; 21:5-20.
- Giguère S, Sweeney RW, Bélanger M. Pharmacokinetics of enrofloxacin in adult horses and concentration of the drug in serum, body fluids and endometrial tissues after repeated intragastrically administered doses. *Am J of Vet Res* 1996;57:1025-30.
- Giguère S, Bélanger M. Concentration of enrofloxacin in equine tissue after long term oral administration. *J Vet Pharmacol Therap* 1997;20:402.
- Giraud E, Cloeckert A, Kerboeup D, Chaslus-Dancla E. Evidence for active efflux as the primary mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1223-8.
- Greene CE, Budsberg SC. Veterinary use of quinolones. In: Hooper DC, Wolfson JS. *Quinolone Antimicrobial Agents*. American Society for Microbiology, Washington 1993:473-88.

- Gruet P, Maincent P, Berthelot X, Kaltsatos V. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;50:245-59.
- Gutierrez-Zufiaurre N. Relation between structure, activity and adverse effects of quinolones. *Rev Esp Quimioter* 2004;17:232-43.
- Gyrd-hansen N, Nielsen P. The influence of feed on the oral bioavailability of enrofloxacin, oxytetracycline, penicillin V and spiramycin in pigs (poster communication). ). Proceeding of the 7<sup>th</sup> Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology. Session 9. Antimicrob and Chemother. Edinburgh, 1994;242-3.
- Haines GR, Brown MP, Gronwall RR, Merritt KA. Serum concentrations and pharmacokinetics of enrofloxacin after intravenous and intragastric administration to mares. *Can J Vet Res* 2000;64:171-7.
- Hannan PCT, O'Hanlon PJ, Rogers NH. In vitro evaluation of various quinolone antibacterial agents against veterinary mycoplasmas and porcine respiratory bacterial pathogens. *Res Vet Sci* 1989;46:202-11.
- Hannan PCT, Windsor GD, De Jong A, Sehmeer N, Stegemann M. Comparative susceptibilities of various animal pathogenic mycoplasma to fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:2037-40.
- Hardwick DC, Linzell JL. Some factors affecting milk secretion by the isolated perfused mammary gland. *J Physiol* 1960;154:547-71.
- Hardwick DC. The fate of acetyl groups derived from glucose in the isolated perfused goat udder. *Biochem J* 1966;99:228-31.
- Haritova A, Lashev L, Pashov D. Pharmacokinetics of enrofloxacin in lactating sheep. *Res Vet Sci* 2003;74:241-5.
- Haritova A, Djeneva H, Lashev L, Sotirova P, Gyurov B, Dyankov V et al. Pharmacokinetics and PK/PD modelling of enrofloxacin in *Meleagris gallopavo* and *Gallus domesticus*. *Bulgarian J Vet Med* 2004;7:139-48.

- Hawkins EC, Boothe DM, Guinn A, Aucoin DP, Nyyuen J. Concentration of enrofloxacin and its active metabolite in alveolar macrophages and pulmonary epithelial lining fluid of dogs. *J Vet Pharmacol Therap* 1998;21:18-23.
- Hayashi N, Nakata Y, Yazaki A. New findings on the structure-phototoxicity relationship and photostability of fluoroquinolones with various substituents at position 1. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:799-803.
- Heinen E, De Jong A, Scheer M. Antimicrobial activity of fluoroquinolones in serum and tissue in turkeys. *J Vet Pharmacol Therap* 1997;20:196-7.
- Heinen E. Comparative serum pharmacokinetics of the fluoroquinolones enrofloxacin, difloxacin, marbofloxacin, and orbifloxacin in dogs after single oral administration. *J Vet Pharmacol Therap* 2002;25:1-5.
- Helmick KE, Papich MG, Vliet KA, Bennett RA, Jacobson ER. Pharmacokinetics of enrofloxacin after single-dose oral and intravenous administration in the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *J Zoo Wildl Med* 2004;35:333-40.
- Higgins NP, Peebles CL, Suguino A, Cozzarelli NR. Purification of subunits of *Escherichia coli* DNA gyrase and reconstitution of enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75:1773-7.
- Higgins PG, Fluit AC, Schmitz FJ. Fluoroquinolones: Structure and target sites. *Curr Drug Targets* 2003;4:181-90.
- Hooper DC. Quinolone mode of action. *Drugs* 1995;49:10-5.
- Hooper DC. New uses for new and old quinolones and the challenge of resistance. *Clin Infect Dis* 2000;30:243-54.
- Hospes R, Seeh C. Endoskopie-Physiologisch Befunde. In: Hospes R (eds). *Sonographie und Endoskopie an der Zitze des Rides*. Stuttgart: Schattauer, 1999. pp.51-100.

- Hubschwerlen C, Specklin JL, Sigwalt C, Schroeder S, Locher H. Design, synthesis and biological evaluation of oxazolidinone-quinolone hybrids. *Bioorg Med Chem* 2003;11:2313-19.
- Hungerford C, Spelman L, Papich MG. Pharmacokinetics of enrofloxacin after oral and intramuscular administration in Savannah monitors (*Varanus exanthematicus*). *Proceeding of the American Association of Zoo Veterinarians*. Houston, 1997;89-92.
- Hyatt JM, McKinnon PS, Zimmer GS, Schentag JJ. The importance of pharmacokinetic/pharmacodynamic surrogate markers to outcome. *Clin Pharmacokinet* 1995;28:143-60.
- Ibrahim KH, Hovde LB, Ross G, Gunderson B, Wright DH, Rotschafer JC. Microbiologic effectiveness of time- or concentration-based dosing strategies in *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;44:265-71.
- Intorre L, Mengozzi G, Maccheroni M, Bertini S, Soldani G. Enrofloxacin-theophylline interaction: influence of enrofloxacin on theophylline steady-state pharmacokinetics in the Beagle dog. *J Vet Pharmacol Therap* 1995;18:352-6.
- Jacobson E. The desert tortoise and upper respiratory tract disease. *Tortuga Gazette* 1991;27:2-3.
- Jacoby GA, Chow N, Waites KB. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:559-62.
- Janion C. A new look at adaptative mutations in bacteria. *Acta Biochim Polonia* 2000;2:451-7.
- Jiménez T, Cantón E, Ramón MS, Gobernado M. Estudio cinético de la actividad bactericida de lomefloxacin sobre *S.aureus* Sa-1 y *P.aeruginosa* Psa-1. *Rev Esp Quimioterap* 1990;3:357-61.
- Johnson RD, Door MB, Hunt TL, Jensen BK, Talbot GH. Effect of food on the pharmacokinetics of sparfloxacin. *Clin Ther* 1999;21:982-91.

- Jordan F, Horrocks B, Froyman R. A model for testing the efficacy of enrofloxacin (Baytril®) administered to turkey hens in the control of *Mycoplasma iowae* infection in heggs and embryos. *Avian Diseases* 1993;37:1057-61.
- Juliano C, Piu L, Gavini E, Zanetti S, Fadda G. In vitro antibacterial activity of antiseptics against vaginal lactobacilli. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:1166-9.
- Kaartinen L, Älli L, Pyörälä S. Pharmacokinetics of enrofloxacin in lactating cows. *Proceeding of the 17<sup>th</sup> World Buiatrics Congress. Bologna, 1994;599-601.*
- Kaartinen L, Salonen M, Älli L, Pyörälä S. Pharmacokinetics of enrofloxacin after single intravenous, intramuscular and subcutaneous injections in lactating cows. *J Vet Pharmacol Therap* 1995;18:357-62.
- Kaartinen L, Panu S, Pyörälä S. Pharmacokinetics of enrofloxacin in horses after single intravenous and intramuscular administration. *Equine Vet J* 1997a;29:378-81.
- Kaartinen L, Pyörälä S, Moilanen M, Raisanen S. Pharmacokinetics of enrofloxacin in newborn and one-week-old calves. *J Vet Pharmacol Therap* 1997b;20:479-482.
- Kahn CM (eds). *The merck veterinary manual*. 9<sup>a</sup>ed. USA: Merck & Co., Inc, 2008.
- Khodursky AB, Cozzarelli NR. The mechanism of inhibition of topoisomerase IV by quinolone antibacterials. *J Biol Chem* 1998;273:27668-77.
- Kietzmann M, Löscher W, Arens D, Maaß P, Lubach D. The isolated perfused bovine udder as an in vitro model of percutaneous drug absorption. Skin viability and percutaneous absorption of dexamethasone, benzoyl peroxide and etofenamate. *J Pharmacol Toxicol Meth* 1993;2:75-84.
- Kietzmann M, Braun M, Schneider M, Pankow R. Tissue distribution of marbofloxacin after systemic administration into the isolated perfused bovine udder. *Vet J* 2008;178:115-8.

- Knight CH, Wilde CJ. Mammary cell changes during pregnancy and lactation. *Livest Prod Sci* 1993;35:3-19.
- Knoll U, Glunder G, Kietzmann M. Comparative study of the plasma pharmacokinetics and tissue concentrations of danofloxacin and enrofloxacin in broiler chickens. *J Vet Pharmacol Therap* 1999;22:239-46.
- Kontos VL, Athanasiou LV. Use of enrofloxacin in the treatment of acute ehrlichiosis. *Canin Pract* 1998;23:10-4.
- Kordick DL, Papich MG, Breitschwert EB. Efficacy of enrofloxacin or doxycyclin for treatment of *Bartonella henselae* or *Bartonella clarridgeiae* infection in cats. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:2448-55.
- Küng K, Rioud L, Wanner M. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and oral administration of enrofloxacin in dogs. *J Vet Pharmacol Therap* 1993;16:462-8.
- Langston VC, Sedrish S, Boothe DM. Disposition of single-dose oral enrofloxacin in the horse. *J Vet Pharmacol Therap* 1997;19:316-9.
- Larson BL. Biosynthesis and cellular secretion of milk. In: Larson BL, Anderson RR (eds). *Lactation*. Ames (USA): Iowa State University Press, 1985. pp.129-63.
- Las Heras HA, Dominguez L, Fernandez-Garayzabal JF. Prevalence and etiology of subclinical mastitis in dairy ewes of the Madrid region. *Small Rumin Res* 1999;32:21-9.
- Legg JM, Bint AJ. Will pneumococci put quinolones in their place? *J Antimicrob Chemother* 1999;44:425-7.
- Lekeux P, Art T. Effect of enrofloxacin therapy on shipping fever pneumonia in feedlot cattle. *Vet Rec* 1988;123:205-7.

- Leshner GY, Froelich EJ, Gruett MD, Baiely JH, Brundage RP. 1,8-naphtyridine derivative. A new class of chemotherapeutic agents. *J Med Pharm Chem* 1962;91:1063-5.
- Lewbart G, Vaden S, Deen J, Manaugh C, Whitt D, Doi A et al. Pharmacokinetics of enrofloxacin in the red pacu (*Colossoma brachypomum*) after intramuscular, oral and bath administration. *J Vet Pharmacol Therap* 1997;20:124-8.
- Lewin CS, Amyes SGB, Smith JT. Bactericidal activity of enoxacin and lomefloxacin against *Escherichia coli* KL16. *Eur J Clin Microbiol Infect* 1989;8:731-3.
- Lewin CS, Amyes SGB. Bactericidal action of PD127,391, an enhanced spectrum quinolone. *J Med Microbiol* 1990;33:67-70.
- Lewis CS, Smith JT. Bactericidal mechanisms of ofloxacin. *J Antimicrob Chemother* 1988;22:1-8.
- Lewis CS, Smith JT. Bactericidal activity of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1989;24:84-5.
- Lewis CS, Morrisey I, Smith JT. The fluoroquinolones exert a reduced rate of kill against *Enterococcus faecalis*. *J Pharm Pharmacol* 1991;43:492-4.
- Lewis RJ, Tsai FT, Wigley DB. Molecular mechanisms of drug inhibition of DNA gyrase. *Bioessays* 1996;8:661-71.
- Lindenstruth H, Frost JW. Enrofloxacin (Baytril®) an alternative for official prophylaxis and treatment of psittacosis in imported psittacine birds. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1993;100:364-8.
- Linzell JL, Fleet IR, Mephram TB, Peaker M. Perfusion of the isolated mammary gland of the goat. *Q J Exp Physiol* 1972;57:139-61.
- Lode H, Bornen K, Koeppe P. Pharmacodynamics of fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* 1998;27:33-9.

## *Bibliografía*

- Lode H. Evidence of different profiles of side effects and drug-drug interactions among the quinolones: the pharmacokinetic standpoint. *Chemother* 2001; 47:24-31.
- Lorenzo P, Aleixandre A. Sulfamidas y trimetoprima. Quinolonas. In: Lorenzo P, Moreno A, Lizasoain I, Leza JC, Moro MA, Portolés A (autores). *Farmacología básica y clínica*. 18ªed. Madrid: Médica Panamericana, 2008. pp.865-8.
- Lorian GR, Sammartino C, Nicholas RA, Ayling RD. In vitro susceptibilities of field isolated of *Mycoplasma agalactiae* to oxytetracycline, tylosin, enrofloxacin, spiramycin and lincomycin-spectinomycin. *Res Vet Sci* 2003;75:3-7.
- Lorian V, Silletti RP, Biondo FX, De Freitas CC. Paradoxical effect of aminoglycoside antibiotics on the growth of Gram-negative bacilli. *J Antimicrob Chemother* 1979;5:613-6.
- Lucas JJ, San Andrés MI, González F, Froyman R, Rodríguez C. Pharmacokinetics behaviour of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after subcutaneous administration in cattle. *Vet Res Commun* 2008;32:275-9.
- Malbe M, Salonen M, Fang W, Ööpik T, Jalakas M, Klaassen M et al. Disposition of enrofloxacin (Baytril®) into the udder after intravenous and intraarterial injections into dairy cows. *J Vet Med* 1996;43:377-86.
- Manceau J, Gicquel M, Laurentie M, Sanders P. Simultaneous determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in animal biological fluids by high-performance liquid chromatography. Application in pharmacokinetics studies in pig and rabbit. *J Chrom* 1999;726:175-84.
- Manes SH, Pruss GJ, Drlica K. Inhibition of RNA synthesis by oxolinic acid is unrelated to average DNA supercoiling. *J Bacteriol* 1983;155:420-3.
- Marco JC. Mastitis en la oveja Latxa: epidemiología, diagnóstico y control [Tesis doctoral] Universidad de Zaragoza; 1994.

- Marians KJ, Hiasa H. Mechanism os quinolone action. *J Biol Chem* 1997;272: 9401-9.
- Marín P. Aplicación de fluoroquinolonas en medicina veterinaria: criterios farmacocinéticos y farmacocinéticos/farmacodinámicos (Pk/Pd) [Tesis doctoral] Universidad de Murcia; 2008.
- Martínez Larrañaga MR, Diaz MJ, Martínez MA, Frejo MT, Bringas P, Anadon A. Bioavailability of enrofloxacin after subcutaneous administration in cattle. *J Vet Pharmacol Therap* 1997;20:52.
- Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998;351:797-9.
- Martínez M, McDermott P, Walker R. Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. *Vet J* 2006;172:10-28.
- Martinsen B, Oppegaard H, Wichstrom R, Myhr E. Temperature-dependent in vitro antimicrobial activity of four 4-quinolones and oxytetracycline against bacteria pathogenic to fish. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;3:1738-43.
- Massart-Leen AM, Peeters G, Vandeputte-VanMessom G, Roets E, Burvenich C. Effect of valerate and isobutyrate on fatty acid secretion by the isolated perfused mammary gland of the lactating goat. *Reprod Nutr Dev* 1986;26:801-14.
- Maxwell A, Critchlow SE. Mode of action. In: Kuhlmann J, Dalhoff A, Zeiler HJ, (eds). *Haadbook of experimental pharmacology-Quinolone antibacterials*. Berlin: Springer-Verlag, 1998. pp.119-66.
- Mäntysaari P. Effect of feeding before puberty and during gestation on milk production potential and body development of dairy replacement heifers. In: Academic dissertation. Department of animal science, University of Helsinki, Finland 2001;60:1-44.
- Mckellar QA. Clinical relevance of the pharmacologic properties of fluoroquinolones. *Suppl Compend Contin Educ Pract Vet* 1996;18:14-21.

## Bibliografía

- Mckellar QA, Gibson I, Monteiro A, Bregante M. Pharmacokinetics study comparing enrofloxacin and danofloxacin in calves. *J Vet Pharmacol Therap* 1997;20:23-4.
- Mckellar QA, Gibson I, Monteiro A, Bregante M. Pharmacokinetics of enrofloxacin and danofloxacin in plasma, inflammatory exudate and bronchial secretions of calves following subcutaneous administration. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1988-92.
- Mckellar QA, Sanchez Bruni SF, Jones DG. Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of antimicrobial drugs used in veterinary medicine. *J Vet Pharmacol Therap* 2004;27:503-514.
- Mengozi G, Intorre L, Bertini S, Soldani G. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and intramuscular administration in sheep. *Am J of Vet Res* 1996;57:1040-3.
- Mitchell MA. Enrofloxacin. *J Exotic Pet Med* 2006;15:66-9.
- Mizuuchi K, O'Dea MH, Gellert M. DNA gyrase: subunit structure and ATPase activity of the purified enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75:5960-3.
- Mohammed H. Kinetics of enrofloxacin in goat following intravenous and intramuscular administration. *Scientific Journal of King Faisal University (Basic and Applied Sciences)* 2005;6:153-62.
- Monlouis JD, De Jong A, Limet A, Richez P. Plasma pharmacokinetics and urine concentrations of enrofloxacin after oral administration of enrofloxacin in dogs. *J Vet Pharmacol Therap* 1997;20:61-3.
- Moretain JP, Boisseau J. Excretion of penicillin and cephalexin in bovine milk following intramammary administration. *Food Addit Contam* 1989;6:79-90.
- Munshi M, Sack D, Haider K, Ahmed Z, Rahaman M, Morshed. Plasmid mediated resistance to nalidixic acid in *Shigella dysenteriae* type I. *Lancet* 1987;22:419-22.

- Nakamura S, Minami A, Nakata K, Kurobe N, Kouno K, Sakaguchi Y et al. In vitro and in vivo antibacterial activities of AT-4140, a new broad-spectrum quinolone. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:1167-73.
- Nakamura S. Mechanisms of quinolone resistance. *J Infect Chemother* 1997;3:128-38.
- Nielsen P. The influence of feed on the oral bioavailability of antibiotics/chemotherapeutics in pigs. *J Vet Pharmacol Therap* 1997;20:30-1.
- Nightingale CH, Grant EM, Quintiliani R. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of levofloxacin. *Chemotherapy* 2000;46:6-14.
- Nikaido H, Thanassi DG. Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: Tetracyclines and Fluoroquinolones as example. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:1393-9.
- Niki Y, Itokawa K, Okazaki O. Effects of DU-6859a, a new quinolone antimicrobial, on theophylline metabolism in in vitro and in vivo studies. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1751-5.
- Nilius AM, Shen LL, Hensey-Rudloff D, Almer LS, Beyer JM, Balli DJ et al. In vitro antibacterial potency and spectrum of ABT-492, a new fluoroquinolone. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3260-9.
- Nix DE, Norman A, Schentag JJ. Inhibition of norfloxacin absorption by antiacids. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:432-5.
- Nouws JFM, Mevius DJ, Vree TB, Baars AM, Laurensen J. Pharmacokinetics, renal clearance and metabolism of ciprofloxacin following intravenous and oral administration to calves and pigs. *Vet Q* 1988;10:156-63.
- Okerman L, Devriese LA, Gevaert D, Uyttebroek E, Haesebrouck F. In vitro activity of orally administered antibiotics and chemotherapeutics against acute septicaemic pasteurellosis in rabbits. *Laboratory Animals* 1990;24:341-4.

- Olsen JD, Booth GD. Normal values for aortic blood pressures and heart rates of cattle. *Cornell Vet* 1971;62:85-100.
- Orden JA, De La Fuente R. Repercusiones en la salud pública de la resistencia a quinolonas en bacterias de origen animal. *Rev Esp Salud Pública* [on-line] 2001 julio-agosto [acceso 21 de septiembre de 2008]; 75 [313-20]. Disponible en: [http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S113557272001000400005&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S113557272001000400005&lng=en&nrm=iso)
- Ortiz A, Froyman R, Kleven SH. Evaluation of enrofloxacin against egg transmission of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Diseases* 1995;39:830-6.
- Otero JL, Mestorino N, Turic E, Pesa J, Errecalde JO. Pharmacokinetics of enrofloxacin after intravenous and intramuscular administration in sheep. *Proceeding of the 8<sup>th</sup> International Congress of the EAVPT*. Israel, 2000;24.
- Otero JL, Mestorino N, Errecalde JO. Enrofloxacin: una fluoroquinolona de uso exclusivo en veterinaria. Parte I: Química, mecanismo de acción, actividad antibacteriana y resistencia bacteriana. *Analecta Vet* 2001a;21:31-41.
- Otero JL, Mestorino N, Errecalde JO. Enrofloxacin: una fluoroquinolona de uso exclusivo en veterinaria. Parte II: Farmacocinética y toxicidad. *Analecta Vet* 2001b;21:42-9.
- Otero JL, Mestorino N, Errecalde JO. Pharmacokinetics of enrofloxacin after single intravenous administration in sheep. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 2009;28:1129-42.
- Owens RC, Ambrose PG. Pharmacodynamics of quinolones. In: Nightingale CH, Murakawa T, Owens RC (eds). *Antimicrobial Pharmacodynamics in Theory and Clinical Practice*. New York: Marcel Dekker, 2002a. pp.55-176.
- Paniagua R. Histología animal: tejidos animales-tejido epitelial. In: Paniagua R, Nistal M, Sesma MP, Álvarez-Uría M, Anadón R, Fraile B et al. (autores). *Citología e histología vegetal y animal*. 3<sup>a</sup>ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana, 2002. pp.497-9.

- Papich MG, Van Camp SD, Cole JA, Whitacre MD. Pharmacokinetics and endometrial tissue concentrations of enrofloxacin and the metabolite ciprofloxacin after i.v. administration of enrofloxacin to mares. *J Vet Pharmacol Therap* 2002;25:343-50.
- Papich MG, Riviere JE. Fluoroquinolonas. In: Adams HR (eds). *Farmacología y terapéutica veterinaria*. 2ªed. Zaragoza: Acribia, 2003. pp.971-4.
- Paradis M, Lemay S, Scott DW, Miller W, Wellington J, Panich R. Efficacy of enrofloxacin in the treatment of canine bacterial pyoderma. *Vet Dermatol* 1990;1:123-7.
- Pascual A, García I. Penetración y actividad intracelular de las fluoroquinolonas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1998;16:138-43.
- Pascual A. La resistencia como factor limitante de la utilización de quinolonas. *Rev Esp Quimioterap* 2003;16:49-50.
- Pastor A, Cantón E, Gobernado M. Efecto postantibiótico (EPA). Métodos de estudio y factores influyentes. *Rev Esp Quimioterap* 1992a;5:201-10.
- Pastor A, Cantón E, Gobernado M. Efecto postantibiótico (EPA). II. Antimicrobianos en que se ha descrito EPA, con especial referencia a las quinolonas. *Rev Esp Quimioterap* 1992b;5:211-8.
- Peeters G, Massart-Leen AM. La perfusion de la glande mammaire isolée. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1947;74:83-9.
- Pellerin JL, Bourdeau P, Sebbag H, Person JM. Epidemiosurveillance of antimicrobial compound resistance of *Staphylococcus intermedium* clinical isolates from canine pyodermas. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1998;21:115-33.
- Pérez-Pérez F, Pérez-Gutiérrez JF. *La glándula mamaria*. Barcelona: Científico-Médica, 1987.

- Peeters G, Massart-Leen AM. La perfusion de la glande mammaire isolée. Arch Int Pharmacodyn Ther 1947;74:83-9.
- Peterson LR. Quinolones molecular structure-activity relationships: What we have learned about improving antimicrobial activity. Clin Infect Dis 2001;33:180-6.
- Petri WA. Antimicrobianos: sulfonamidas, trimetroprim-sulfametoxazol, quinolonas y fármacos contra infecciones de vías urinarias. In: Hardman JG, Limbird LE (eds). Goodman & Gilman Las bases farmacológicas de la terapéutica. 10ªed. México: McGraw-Hill Interamericana, 2003. pp.1200.
- Petri WA. Penicilinas, cefalosporinas y otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos. In: Brunton L, Lazo J, Parker K (eds). Goodman & Gilman Las bases farmacológicas de la terapéutica. 11ªed. México: McGraw-Hill Interamericana, 2006. pp.1127-53.
- Pickerill KE, Paladino JA, Schentag JJ. Comparison of the fluoroquinolones based on pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. Pharmacotherapy 2000;20:417-28.
- Pijpers A, Heinen E, De Jong A, Verheijden JHM. Enrofloxacin pharmacokinetics after intravenous and intramuscular administration in pigs. J Vet Pharmacol Therap 1997;20:42-3.
- Piriz S, Valle J, Mateos EM, De La Fuente R, Cid D, Ruiz-Santaquiteria JA et al. In vitro activity of fifteen antimicrobial agents against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus intermedius*. J Vet Pharmacol Therap 1996;21:18-23.
- Pittermann W. In-vitro skin and mucous membrane tests in the focus of cosmetics research. In: Parfümerie & Kosmetik 1999;80:38-41. Disponible en: [http://www.gd-online.de/english/originals\\_e/Pittermann2000.htm](http://www.gd-online.de/english/originals_e/Pittermann2000.htm)
- Pozzin O, Harron DWG, Nation G, Tinson AH, Sheen R, Dhanasekharan S. Pharmacokinetics of enrofloxacin following intravenous, intramuscular and oral administration in Nedji sheep. J Vet Pharmacol Therap 1997;20:60.

- Prescott JF, Yielding KM. In vitro susceptibility of selected veterinary bacterial pathogens to ciprofloxacin, enrofloxacin and norfloxacin. *Can J Vet Res* 1990;54:195-7.
- Preston SL, Drusano GL, Berman AL, Fowler CL, Chow AT, Dornseif B et al. Pharmacodynamics of levofloxacin: a new paradigm for early clinical trials. *J Am Vet Med Assoc* 1998;279:125-9.
- Prezant RM, Isaza R, Jacobson ER. Plasma concentrations and disposition kinetics of enrofloxacin in Gopher tortoises (*Gopherus polyphemus*). *J Zoo Wildl Med* 1994;25:82-7.
- Pyörälä S, Panu S, Kaartinen L. Single dose pharmacokinetics of enrofloxacin in horses (poster communications). Proceeding of the 7<sup>th</sup> Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology. Session 9. Antimicrob and Chemother. Edinburgh, 1994;45-6.
- Pyörälä S. Antimicrobial treatment of mastitis: choice of the route of administration and efficacy. Proceeding of the British Mastitis Conference. Brockworth, 2002;20-9.
- Rahal A, Kumar A, Ahmad AH, Malik JK, Ahuja V. Pharmacokinetics of enrofloxacin in sheep following intravenous and subcutaneous administration. *J Vet Pharmacol Therap* 2006;29:321-4.
- Ramesh S, Rao GS, Malik JK. Pharmacokinetic disposition of subcutaneously administered enrofloxacin in goats. *Vet Res Commun* 2002;26:563-9.
- Ramón MS, Canton E, Pemán J, Pastor A, Martínez JP. Mechanisms of action of quinolones against Staphylococci and relationship with their in vitro bactericidal activity. *Chemotherapy* 1999;45:175-82.
- Rao GS, Ramesh S, Ahmad AH, Tripathi HC, Sharma LD, Malik JK. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intramuscular administration of enrofloxacin in goats. *Vet Res Commun* 2001;25:197-204.

## Bibliografía

- Rao GS, Ramesh S, Ahmad AH, Tripathi HC, Sharma LD, Malik JK. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in goats given enrofloxacin alone and in combination with Probenecid. *Vet J* 2002a;163:85-93.
- Rao GS, Ramesh S, Ahmad AH, Tripathi HC, Sharma LD, Malik JK. Disposition kinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin following intravenous administration of enrofloxacin in goats. *Small Rumin Res* 2002b;44:9-15.
- Raphael BL, Papich MG, Cook RA. Pharmacokinetics of enrofloxacin after a single intramuscular injection in Indian star tortoises (*Geochelone elegans*). *J Zoo Wildl Med* 1994;25:88-94.
- Ratcliffe NT, Smith JT. Ciprofloxacin and ofloxacin exhibit a rifampicin-resistant bactericidal mechanism not detectable in other 4-quinolone antibacterial agents. *J Pharm Pharmacol* 1984;36:59.
- Ratcliffe NT, Smith JT. Norfloxacin has a novel bactericidal mechanism unrelated to that of other 4-quinolones. *J Pharm Pharmacol* 1985;37:2-93.
- Reece RJ, Maxwell A. The C-terminal domain of the *Escherichia coli* DNA gyrase A subunit is a DNA-binding protein. *Nucleic Acid Res* 1991;19:1399-405.
- Richez P, Dellac B, Froyman R. Petics and bioavaibility of enrofloxacin in pigs after single and repeated in-feed medication with Baytril® I.E.R. 2,5 % (oral communications). Proceeding of the 7<sup>th</sup> Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology. Session 9. Antimicrob and Chemother. Edinburgh, 1994a;207.
- Richez P, Dellac B, Froyman R, De Jong A. Pharmacokinetics of enrofloxacin in calves and adult cattle after single and repeated subcutaneous injections (poster communications). Proceeding of the 7<sup>th</sup> Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology. Session 9. Antimicrob and Chemother. Edinburgh, 1994b;232-4.

- Richez P, Pederson Mörner A, De Jong A, Monlouis JD. Plasma pharmacokinetics of parenterally administered danofloxacin and enrofloxacin in pigs. *J Vet Pharmacol Therap* 1997a;20:41-2.
- Richez P, Monlouis JD, Dellac D, Daube G. Validation of a therapeutic regimen for enrofloxacin in cats on the basis of pharmacokinetic data. *J Vet Pharmacol Therap* 1997b;20:152-3.
- Riesenfeld C, Everett M, Piddock L, Hall B. Adaptive mutations produce resistance to ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;9:2059-60.
- Rohlfing SR, Gerster JR, Kvam DC. Bioevaluation of the antibacterial flumequine for urinary tract use. *J Antimicrob Chemother* 1976;10:20-4.
- Rollins LD, Mercer HD, Carter GG, Kramer J. Absorption, distribution and excretion of penicillin and dihydrostreptomycin in dairy cows following intramammary infusion. *J Dairy Sci* 1970;53:1407-14.
- Ruberte J, Carretero A, Fernández M, Navarro M, Caja G, Kirchner F et al. Ultrasound mammography in the lactating ewe and its correspondence to anatomical section. *Small Rumin Res* 1994a;13:199-204.
- Ruberte J, Carretero A, Fernández M, Pons M, Giné JM, Sautet J. Anatomía de la ubre de la oveja. *Ovis* 1994b;32:9-16.
- Sadiek A. Effects of orally administered enrofloxacin (Baytril®) on the ruminal functions of adult cattle (in vivo). *Assiut Vet Med J* 1996;35:114-29.
- Sanchez-Céspedes J, Navia M, Martínez R, Orden B, Millan R, Ruiz J et al. Clonal dissemination of *Yersinia enterocolitica* strains with various susceptibilities to nalidixic acid. *J Clin Microbiol* 2003;41:1769-71.
- Sandholm M, Kaartinen L, Pyörälä S. Bovine mastitis-why does antibiotic therapy not always work?. *J Vet Pharmacol Therap* 1990;13:248-60.

## *Bibliografía*

- Satoh Y, Sygiyama A, Chiba K, Tamura K, Hashimoto K. QT-prolonging effects of sparfloxacin, a fluoroquinolone antibiotic, assessed in the in vivo canine model with monophasic action potential monitoring. *J Cardiovasc Pharmacol Therapeut* 2000;36:510-5.
- Scheer M. Studies on the antibacterial activity of Baytril®. *Vet Med Rev* 1987a; 2:90-9.
- Scheer M. Concentrations of active ingredient in the serum and in tissue after oral and parenteral administration of Baytril®. *Vet Med Rev* 1987b;2:104-18.
- Scheer M, Pirro F, Schmeer N. Baytril® I.E.R. 2,5 %. A new formulation for the oral application on swine. Antibacterial activity, pharmacokinetic and bioavailability. *Tierarztl Umschau* 1996;51:489.
- Schentag JJ. Antimicrobial action and pharmacokinetics/pharmacodynamics: The use of AUC to improve efficacy and avoid resistance. *J Chemother* 1999;11:426-39.
- Schentag JJ, Gilliland KK, Paladino JA. What have we learned from pharmacokinetic and pharmacodynamic theories?. *Clin Infect Dis* 2001;32:39-46.
- Schlüter S. Ciprofloxacin: a review of potential toxicologic effects. *Am J Med* 1987;82:91-3.
- Schmidt GH. Anatomía de la glándula mamaria. In: Schmidt GH, Burgos Gonzalez JT (autores). *Biología de la lactación*. Zaragoza: Acribia, 1974. pp.16-41.
- Schwarze E, Schröder L. *Compendio de Anatomía Veterinaria*. Zaragoza: Acribia, 1984.
- Serjrsen K, Huber JT, Tucker HA, Akers RM. Influence of nutrition on mammary development in pre and postpubertal heifers. *J Dairy Sci* 1982;65:793-8.
- Shah PM, Troche G, Stille W. Effect of concentration on bactericidal activity of cefotaxime. *J Antimicrob Chemother* 1979;5:419-22.

- Sharma PK, Ahmad AH, Sharma LD, Varma R. Pharmacokinetics of enrofloxacin and the rate of formation of its metabolite ciprofloxacin following intravenous and intramuscular single dose administration to male buffalo calves. *Vet J* 2003;166:101-4.
- Sheer M. Studies on the antimicrobial activity of Baytril<sup>®</sup> TM. *Vet Med Rev* 1987;2:90-9.
- Sierra JM, Martinez-Martinez J, Vazquez F, Giralt E, Vila J. Relationship between mutations in the *gyrA* gene and quinolone resistance in clinical isolates of *Corynebacterium striatum* and *Corynebacterium amycolatum*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:1714-9.
- Smith JT. The mode of action of 4-quinolones and possible mechanism of resistance. *J Antimicrob Chemother* 1986;18:21-9.
- Soliman GA. Tissue distribution and disposition kinetics of enrofloxacin in healthy and *E.coli* infected broilers. *Dtsch Tierartl Wochenschr* 2000,107:23-7.
- Sprandel KA, Rodvold KA. Safety and tolerability of fluoroquinolones. *Clin Cornerstone* 2003;3:29-36.
- Spreng M, Deleforge J, Thomas V, Boisramé B, Drugeon H. Antibacterial activity of marbofloxacin. A new fluoroquinolone for veterinary use against canine and feline isolates. *J Vet Pharmacol Therap* 1995;18:284-9.
- Stahlmann R, Lode H. Toxicity of quinolones. *Drugs* 1999;58:37-42.
- Stahlmann R. Clinical toxicological aspects of fluoroquinolones. *Toxicol Lett* 2002;127:269-77.
- Stegemann M, Heukamp U, Scheer M, Krebber R. Kinetics of antibacterial activity after administration of enrofloxacin in dog serum and skin: in vitro susceptibility of firdl isolates. *Suppl Compend Contin Educ Pract Vet* 1996;18:30-4.

## Bibliografía

- Stegemann M, Wollen TS, Ewert KM, Terhune TN, Copeland DD. Plasma pharmacokinetics of enrofloxacin administered to cattle at a dose of 7,5 mg/kg. *J Vet Pharmacol Therap* 1997;20:22-3.
- Stein GE. Pharmacokinetics and pharmacodynamic of newer fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* 1996;23:19-24.
- Steeve G, Raymond WS, Myriam B. Pharmacokinetics of enrofloxacin in adult horses and concentration of the drug in serum, body fluids and endometrial tissues after repeated intragastrically administered doses. *Am J of Vet Res* 1996;57:1025-30.
- Stoffregen DA, Chako AJ, Backman S, Babish JG. Successful therapy of furunculosis in Atlantic salmon *Salmo salar* L. using the fluoroquinolone antimicrobial agent enrofloxacin. *J Fish Dis* 1993;16:219-28.
- Stratton CW. The safety profile of fluoroquinolones. *Antimicrob Infect Dis Newsl* 1998;17:57-64.
- Studdert VP, Hughes KL. Treatment of opportunistic mycobacterial infections with enrofloxacin in cats (clinical reports). *J Am Vet Med Assoc* 1992;201:1388-90.
- Such X., Ayadi M. Bases anatómicas y fisiológicas de la secreción y de la eyección láctea. In: Buxadé C (eds). *El ordeño en el ganado vacuno: aspectos claves*. 2ªed. Madrid: Mundi-Prensa, 2002. pp.51-90.
- Sumano LH. Quinolonas y fluoroquinolonas en medicina veterinaria. *Vet México* 1993;24:83-92.
- Sumano LH, Ocampo CL, Brumbaugh GW, Lizarraga RE. Effectiveness of two fluoroquinolones for the treatment of chronic respiratory disease out break in broilers. *British Poultry Sciences* 1998;39:42-6.
- Sumano LH, Gutierrez OL, Zamora MA. Bioequivalence of four preparations of enrofloxacin in poultry. *J of Vet Pharmacol Therap* 2001;24:309-13.

- Sumano LH, Gutierrez OL, Zamora MA. Strategic administration of enrofloxacin in poultry to achieve higher maximal serum concentrations. *Vet J* 2003;165:143-8.
- Takács-Novák K, Józán M, Hermeecz I, Szász G. Lipophilicity of antibacterial fluoroquinolones. *Int J Pharm* 1992;79:89-96.
- Takayama S, Kato M, Shimada H. Toxicity of quinolones antimicrobial agents. *J Toxicol Environ Health* 1995;45:1-45.
- Takiff HE, Salazar L, Guerrero C, Philipp W, Huang WM, Kreiswirth B et al. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis* gyrA and gyrB genes and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:773-780.
- Taylor DE, Chau AS. Cloning and nucleotide sequence of the gyrA gene from *Campylobacter fetus* subsp. *Fetus* ATCC 27374 and characterization of ciprofloxacin-resistant laboratory and clinical isolated. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:665-71.
- TerHune TN, Skogerboe TL, Shostrom VK, Weigel DJ. Comparison of pharmacokinetics of danofloxacin and enrofloxacin in calves challenged with *Mannheimia haemolytica*. *Am J of Vet Res* 2005;66:342-9.
- Tietz NW (eds). *Clinical guide to laboratory tests*. 3<sup>rd</sup>ed. Philadelphia: WS Saunders, 1995. pp.382-3.
- Tolman B, Mckusick BC. The effect of growth rate on mammary development in ewe lambs. *Proceeding of the 7<sup>th</sup> Great Dairy Sheep Symposium*. Wisconsin, 2001;143-55.
- Toutain PL, Castello JRE, Bonsquet-Melou A. The pharmacokinetic-pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics. *Res Vet Sci* 2002;73:105-14.

- Toutain PL, Lees P. Integration and modelling of pharmacokinetic and pharmacodynamic data to optimize dosage regimens in veterinary medicine. *J Vet Pharmacol Therap* 2004;27:467-477.
- Tran J, Jacoby GA. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:5638-42.
- Turnidge JD, Gudmundsson S, Vogelmann B, Craig WA. The postantibiotic effect of antifungal agents against common pathogenic yeasts. *J Antimicrob Chemother* 1994;34:83-92.
- Turner CW. The anatomy of the udder sheep. In: Lucas Brothers (eds). *The anatomy of the mammary gland*. Missouri: Columbia, 1952. pp.315-31.
- Tyczkowska K, Hedeem KM, Aucoin DP, Aronson AL. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of enrofloxacin and its primary metabolite ciprofloxacin in canine serum and prostatic tissue. *J Chrom* 1989;493:337-46.
- Van Boven M, Veldman KT, De Jong MC, Mevius DJ. Rapid selection of quinolone resistance in *Campylobacter jejuni* but not in *Escherichia coli* in individually housed broilers. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:719-23.
- Vancutsem PM, Babish JG, Schwark WS. The fluoroquinolone antimicrobials: structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity. *Cornell Vet* 1990;80:173-86.
- Van Duijkeren E, Van klingereren B, Vulto Ag, Sloet Van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM, Breukink HJ, Van Miert ASJPAM. In vitro susceptibility to antimicrobial drugs of 62 Salmonella strains isolated from horses in the Nederland. *Vet Microbiol* 1995;45:19-26.
- Varma R, Ahmad AH, Sharma LD, Aggarwal P, Ahuja V. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its active metabolite ciprofloxacin in cows following single dose intravenous administration. *J Vet Pharmacol Therap* 2003;26:303-5.

- Vila J, Ruiz J, Goni P, De Anta MT. Detection of mutations in parC in quinolone-resistant clinic isolated of *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 1996;40:491-3.
- Villa R, Prandini E, Caloni R, Carli S. Serum protein binding of some sulfonamides, quinolones and fluoroquinolones in farm animals and domestic animals. J Vet Pharmacol Therap 1997;20:34-5.
- Wagner JG. Pharmacokinetics for the Pharmaceutical Scientist. Lancaster: Technomic, 1993.
- Wallmann J. Monitoring of antimicrobial resistance in pathogenic bacteria from livestock animals. Int J Med Microbiol 2006;296:81-6.
- Walser K, Gandorfer B, Steinberger A, Treitinger E, Winter T. Studies of the antibacterial activity and pharmacokinetics of enrofloxacin (Baytril<sup>®</sup>) in lactating cows. Tierarztl Umschau 1993;48:414.
- Walker RD, Stein GE, Hauptman JG, MacDonald KH. Pharmacokinetic evaluation of enrofloxacin administered orally to healthy dogs. Am J of Vet Res 1992;53:2315-9.
- Walker RD. The use of fluoroquinolones for companion animal antimicrobial therapy. Aust Vet J 2000;78:84-9.
- Wang Y, Huang WM, Taylor DE. Cloning and nucleotide sequence of the *Campylobacter jejuni* gryA gene and characterization of quinolone resistance mutations. Antimicrob Agents Chemother 1993;37:457-63.
- Wang M, Tran JH, Jacoby GA, Zhang Y, Wang F, Hooper DC. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:2242-8.
- Watts JL, Salmon SA, Sanchez MS, Yancey RJ. In vitro activity of premafloxacin, a new extended-spectrum fluoroquinolone, against pathogens of veterinary importance. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:1190-2.

## Bibliografía

- Weber M, Piddock L. Absence of mutations in marRAB or soxRS in acrB-overexpressing fluoroquinolone-resistant clinic and veterinary isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1550-2.
- Wetzstein HG, De Jong A. In vitro bactericidal activity and postantibiotic effect of fluoroquinolones used in veterinary medicine. *Suppl Compend Contin Educ Pract Vet* 1996;18:22-9.
- Williams PJ, Courtenay SC, Vasdy C. Use of enrofloxacin to control atypical *Aeromonas salmonicida* in Atlantic tomcod. *J Aquat Anim Health* 1997; 9:216-22.
- Winshell EB, Rosenkraz HS. Nalidixic acid and the metabolism of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1970;104:1168-75.
- Wise R. Comparative penetration of selected fluoroquinolones into respiratory tract fluids and tissues. *Am J Med* 1991;91:67-70.
- Wolfson JS, Hooper DC. The fluoroquinolones: structures, mechanisms of action and resistance, and spectra of activity in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1985;28:581-6.
- Wolfson JS, Hooper DC. Fluoroquinolone antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 1989;2:378-424.
- Wolfson JS, Hooper DC. Pharmacokinetics of quinolones: newer aspects. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991;10:267-74.
- Wood HG, Peeters G, Verbeke R, Lauryssens M, Jacobson B. Estimation of the pentose cycle in the perfused cows udder. *Biochem J* 1965;96:607-15.
- Wright DH, Brown GH, Peterson ML, Rotschafer JC. Application of fluoroquinolone pharmacodynamics. *J Antimicrob Chemother* 2000;46:669-83.

- Yamaoka K, Nakagawa T, Uno T. Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *J Pharmacokinet Biopharm* 1978a;6:165-75.
- Yoon JH, Brooks RL, Khan A, Pan H, Bryan J, Zhang J et al. The effect of enrofloxacin on cell proliferation and proteoglycans in horse tendon cells. *Cell Biol Toxicol* 2004;20:41-54.
- Yoshida H, Bogaki M, Nakamura S, Ubukata K, Konno M. Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* norA gene, which confers resistance to quinolones. *J Bacteriol* 1990;172:6942-9.
- Young LA, Schumacher J, Papich MG, Jacobson E. Disposition of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after IM injection in Burmese Pythons (*Python molurus bivittatus*). *J Zoo Wildl Med* 1997;28:71-9.
- Zechiedrich EL, Cozzarelli NR. Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 1995;9:2859-69.
- Zehl U. Beitrag zur Pharmakokinetik des neuen Gyrasehemmers Baytril® (enrofloxacin) beim Pferd [Tesis doctoral]. Hannover: Tierärztliche Hochschule;1989.
- Zeitlin IJ, Eshraghi HR. The release and vascular action of bradykinin in the isolated perfused bovine udder. *J Physiol* 2002;543:221-31.
- Zeller V, Janoir C, Kitzis M, Gutmann L, Moreu N. Active efflux as a mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents Chemother* 1997;41:1973-8.
- Zeng Z, Fung K. Effects of experimentally induced *Escherichia coli* infection on the pharmacokinetics of enrofloxacin in pigs. *J Vet Pharmacol Therap* 1997;20:39-40.
- Zhanell GG. Influence of pharmacokinetic and pharmacodynamic principles on antibiotic selection. *Curr Infect Dis Rep* 2001;3:29-34.

*Bibliografía*

Ziv G. Drug selection and use in mastitis: systemic vs. local therapy. J Am Vet Med Assoc 1980;176:1109-15.

Ziv G, Soback A, Kurtz B, Glickman A, Winkler M. Concentrations of antibacterial quinolones in blood and milk. J Vet Med 1990;9:171-82.

Ziv G. Pharmacokinetics of antibacterial fluoroquinolones in small and large animal practice. Proceeding of the 6<sup>th</sup> Congress of EAVPT. Edinburgh, 1994;194-6.