



Universidad Nacional del Litoral

Facultad de Ciencias Veterinarias

Cátedra de Farmacología

Tesis para optar al Grado Académico de Doctor en Ciencias Veterinarias

**ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS FARMACOCINÉTICAS DE
MARBOFLOXACINA EN BÚFALOS (*BUBALUS BUBALIS*) DE DIFERENTES
EDADES TRAS LA ADMINISTRACIÓN IV, IM, SC Y PO EN DOSIS ÚNICA.**

Doctorando: Carlos Lüders

Director: Eduardo Baroni

Co-Director: Manuel San Andrés

2015

DIRECTOR

Dr. Eduardo Baroni

CO-DIRECTOR

Dr. Manuel San Andrés

COMISION DE TESIS Y JURADO

Dra. Marcela Rebuelto:

Dr. Rafael Althaus:

Dr. Sergio Sánchez Bruni:

A mi familia y amigos

AGRADECIMIENTOS

A mi Señora e hijos por la paciencia y comprensión.

Al Dr. Eduardo Baroni por su incondicional y constante apoyo a lo largo de estos años que se resumen en este documento.

Al Dr. Manuel San Andres Larrea, por su paciencia y constante apoyo durante el estudio aquí expuesto, y por su intermedio a su tremendo equipo de trabajo en España, a todos, mis agradecimientos y reconocimiento.

Finalmente a Dios por haberme puesto en el camino de la vida a tan bellas personas que permitieron avanzar en los momentos más difíciles.

INDICE GENERAL	Pág.
INDICE DE FIGURAS	I
INDICE DE TABLAS	II
ABREVIATURAS	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Características del sistema de producción de búfalos.....	1
1.2 Principios de la terapéutica.....	2
1.3 Características de las fluoroquinolonas.....	5
1.4 La edad y la disposición de los fármacos.....	7
1.5 Eficacia terapéutica, índices PK/PD.....	12
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO	15
3. OBJETIVOS	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS	16
4.1 Material farmacológico.....	16
4.2 Material biológico.....	16
4.3 Método.....	16
4.3.1 Grupos experimentales.....	16
4.3.2 Diseño y Condiciones experimentales.....	17
4.3.3 Toma de muestra.....	18
4.3.4 Determinación de las concentraciones séricas por HPLC.....	18
4.3.5 Cálculo de los parámetros farmacocinéticos.....	22
4.3.6 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM).....	22
4.3.7 Índices de Eficacia, relación PK/PD y cálculo de dosis efectiva.....	23
4.4 Análisis estadístico.....	23
5. RESULTADOS	24
5.1 Validación de técnica HPLC para la cuantificación de marbofloxacin en suero.....	24
5.2 Farmacocinética de marbofloxacin tras la administración endovenosa a distintas edades.....	24
5.3 Farmacocinética de marbofloxacin tras la administración intramuscular y subcutánea 7-10 días.....	28
5.4 Farmacocinética marbofloxacin tras la administración oral a distintas edades.....	30
5.5 Valores de eficacia terapéutica según índices PK/PD.....	36
6. DISCUSIÓN	40
7. CONCLUSIONES	49
8. BIBLIOGRAFÍA	50

Nº	INDICE DE FIGURAS	Pág.
1	Curva semilogaritmica de concentración en función del tiempo de marbofloxacin (X $\pm$ D.E.) administrado por vía endovenosa (2 mg/kg) a búfalos de diferentes edades dentro de su primeros 50 días de vida.	24
2	Valores promedio de la semivida de eliminación ($t_{1/2\lambda}$) $\pm$ D.E. de marbofloxacin tras su administración endovenosa a las diferentes edades en estudio.	26
3	Valores promedio del área bajo la curva (AUC) $\pm$ D.E. de marbofloxacin tras su administración endovenosa a las diferentes edades en estudio.	26
4	Valores promedio del volumen de distribución en estado de equilibrio (V_{ss}) $\pm$ D.E. de marbofloxacin tras su administración endovenosa a las diferentes edades en estudio.	27
5	Valores promedio del volumen del aclaramiento total (Cl_t) $\pm$ D.E. de marbofloxacin tras su administración endovenosa a las diferentes edades en estudio.	28
6	Curva semilogaritmica de concentración en función del tiempo de marbofloxacin (X $\pm$ D.E.) administrado por vía endovenosa, intramuscular y subcutánea (2 mg/kg) a búfalos de 7 – 10 días de vida.	29
7	Curva semilogaritmica de concentración en función del tiempo de marbofloxacin (X $\pm$ D.E.) administrado por vía oral (2,5 mg/kg) a búfalos de diferentes edades dentro de su primeros 50 días de vida.	31
8	Valores promedio de la semivida de absorción ($t_{1/2ab}$) $\pm$ D.E. de marbofloxacin tras su administración oral a las diferentes edades en estudio.	32
9	Valores promedio del tiempo máximo (T_{max}) $\pm$ D.E. de marbofloxacin tras su administración oral a las diferentes edades en estudio.	33
10	Valores promedio de la concentración máxima (C_{max}) $\pm$ D.E. de marbofloxacin tras su administración oral a las diferentes edades en estudio.	33
11	Valores promedio de la semivida de eliminación ($t_{1/2\lambda}$) $\pm$ D.E. de marbofloxacin tras su administración oral a las diferentes edades en estudio.	34
12	Valores promedio del área bajo la curva (AUC) $\pm$ D.E. de marbofloxacin tras su administración oral a las diferentes edades en estudio.	35
13	Porcentaje promedio de la biodisponibilidad (F) $\pm$ D.E. de marbofloxacin tras su administración oral a las diferentes edades en estudio.	35

Nº	INDICE DE TABLAS	Pág.
1	Parámetros farmacocinéticos de marbofloxacin administrada por vía endovenosa (2 mg/kg) en búfalos a diferentes edades dentro de su primeros 50 días de vida.	25
2	Parámetros farmacocinéticos de marbofloxacin administrada por vía intramuscular (IM) y subcutánea (SC) a búfalos de 7 a 10 días de edad.	30
3	Parámetros farmacocinéticos de marbofloxacin administrada por vía oral (2,5 mg/kg) en búfalos a diferentes edades dentro de su primeros 50 días de vida.	31
4	Valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) de marbofloxacin ante cepas bacterianas aisladas de casos clínicos bovinos de un establecimiento lechero.	36
5	Predictores de eficacia terapéutica (C_{max}/CIM y AUC_{0-24}/CIM) estimados para marbofloxacin tomando valore de CIM_{90} de cepas aisladas de casos clínicos bovinos.	37
6	Valores teóricos de CIM_{90} necesarios para cumplir con los índices de eficacia a la dosis de 2 mg/kg según la vía de administración y edad del búfalo.	38
7	Dosis de marbofloxacin recomendada según edad y vía para lograr la eficacia terapéutica ante <i>Salmonella spp.</i>	39

ABREVIATURAS

$t_{1/2ab}$: semivida de absorción

$t_{1/2\lambda}$: semivida de eliminación

V_z : volumen de distribución aparente

V_{ss} : volumen de distribución en estado de equilibrio

Cl_t : tasa de depuración plasmática total, o Aclaramiento total

AUC_{∞} : área bajo la curva de concentración en función del tiempo extrapolado a infinito

AUC_{0-24} : área bajo la curva de concentración en función del tiempo desde 0 a 24 horas

MRT: tiempo medio de residencia

C_{max} : concentración máxima

T_{max} : tiempo a la que se produce la C_{max}

Lag time: tiempo de latencia

MAT: tiempo medio de absorción

F: biodisponibilidad

CIM: Concentración Inhibitoria Mínima

RESUMEN

La producción de búfalos está asociada a patologías bacterianas. Las dosificaciones para esta especie son extrapoladas del bovino. La marbofloxacinina está indicada para procesos infecciosos respiratorios y diarreas neonatales en bovinos. El objetivo del estudio fue describir y comparar la disposición de marbofloxacinina administrada por distintas vías dentro los primeros 60 días de vida de bucerros, proponiendo un régimen de dosificación efectiva mediante parámetros PK/PD. El estudio se realizó con bucerros clínicamente sanos en grupos etarios entre los 2 y 50 días de vida. Recibieron 2 mg/kg por las vías endovenosa, intramuscular, subcutánea y 2,5 mg/kg para la vía oral. Las concentraciones de marbofloxacinina en muestras de sangre colectadas a tiempos regulares se determinaron por HPLC, la curva de concentración se analizó por un modelo no compartimental, estimándose los índices de eficacia terapéutica PK/PD. Los parámetros cinéticos robustos entre las edades presentan diferencias significativas. La absorción de marbofloxacinina presenta fuerte variación individual y su biodisponibilidad se reduce a medida que se incrementa la edad. La absorción de marbofloxacinina por la vía intramuscular y subcutánea es prácticamente total, exhibiendo rápidamente concentraciones plasmáticas similares a la vía endovenosa. Se concluye que marbofloxacinina es efectiva en bucerros después de la administración de 2 mg/Kg por vía SC o IM para tratar diarreas e infecciones respiratorias causadas por las bacterias susceptibles. En caso de la vía oral requiere incrementarse la dosis en un 235%. Futuros estudios son necesarios para obtener los valores de CIM de las bacterias aisladas de bucerros enfermos.

ABSTRACT

Buffalo production is associated with bacterial diseases. Dosages for this species are extrapolated from cow. Marbofloxacin is indicated for respiratory infectious diseases and neonatal diarrhea in cattle. The aim of the study was to describe and compare the pharmacokinetic of marbofloxacin administered by different routes within the first 60 days of life of buffalo calves by proposing an effective dosage regimen using PK/PD parameters. The study was conducted with clinically healthy buffalo calves in age groups between 2 and 50 days old. They received 2 mg/kg intravenously, intramuscular or subcutaneously and 2.5 mg/kg orally. Marbofloxacin concentrations in blood samples collected at regular times were determined by HPLC, the concentration curve is analyzed by non-compartmental model and estimated therapeutic efficacy PK/PD indices. The robust kinetic parameters ages differ significantly. The absorption of marbofloxacin has strong individual variation and its bioavailability decreases as age increases. Marbofloxacin absorption after intramuscular and subcutaneous administration is practically total, similar to the intravenously exhibiting plasma concentrations. Its conclude that marbofloxacin is effective in buffalo calves after administration of 2 mg/kg SC or IM to treat diarrhea and respiratory infections caused by susceptible bacteria. Oral dose requires increased by 235%. Future studies are needed to obtain the MIC values of the bacteria isolated from buffalo calves.

1. INTRODUCCION

1.1- Características del sistema de producción de búfalos

El búfalo pertenece al orden artiodactyla, suborden ruminantia de la familia *bovidae*, subfamilia de los *Bubalinae*, subespecie *Bubalus bubalis*, del tipo Asiático. El 97% de existencias de la especie, conocida como “Búfalo de Agua”, se encuentra en el continente Asiático. El crecimiento mundial en el periodo 1993 - 2004 según la FAO fue del 12,24 %. Se estima que actualmente en el continente americano existen 3.800.000 búfalos. Su producción se asocia a sistemas de producción extensiva, ocupando las zonas marginales e inundables, siendo sus productos primarios la carne y la leche (Zapata, 2006; FAO 2014).

En Argentina para el año 1976 se registraron 1.300 búfalos cuyo número se incrementa en el año 2005 a 80.000 cabezas aproximadamente, se distribuyen desde el Norte del Delta Bonaerense hasta los límites con el Paraguay, principalmente en las provincias de Formosa, Corrientes y Chaco concentrando el 90% de la población bubalina. Esta distribución, coincide con suelos anegados o con inundaciones frecuentes, altas temperaturas, baja calidad forrajera, alta incidencia de parásitos y enfermedades. En estos ambientes, el búfalo demuestra excelentes resultados productivos si lo comparamos con el bovino, de baja adaptación a estas condiciones (Zapata, 2006). Estas ventajas, según diversos autores, radican principalmente a diferencias en la anatomía y fisiología del sistema digestivo tales como, longitud y capacidad del tracto gastrointestinal, tipo y cantidad de masticaciones, frecuencia ruminal, ecosistema y metabolismo ruminal, digestibilidad y degradación de nutrientes (Franzolin, 1994; Bartocci y col., 1997; Cruz y col., 2001). Por otro lado, se documentan diferencias fisiológicas en el ciclo reproductivo, metabolismos hepático, porcentaje de tejido adiposo y condición corporal, como así también características de la piel que le permiten a los búfalos contar con una mayor resistencia a los parásitos externos y mejor termo regulación (Mason, 1974; Groves, 1989; Baroni y col., 2007)

Además de su adaptabilidad posee una mayor capacidad de conversión de alimento, llegando a duplicar al bovino. Poseen mayor masa muscular, representa un 36% del

peso de la canal, frente al 33% del vacuno, lo que hace que sea una especie de gran interés en la explotación ganadera (Zapata, 2006).

Al igual que en otras especies, la producción comercial de los búfalos y sus crías no está exenta de presentar enfermedades de origen bacteriano que causan mermas productivas. En algunas áreas, la cría de búfalos se hace de forma conjunta con ganado bovino y consecuentemente están sujetos a padecer enfermedades que afectan a ambas especies. Las afecciones son abordadas terapéuticamente con fármacos con esquemas posológicos definidos para el bovino, no así para Búfalos. Las dosis y ritmos para esta especie son mera extrapolación empírica del bovino debido a que no se cuentan con datos farmacocinéticos en la especie, lo que lleva a cometer errores terapéuticos en desmedro de la efectividad y seguridad terapéutica, ya que se han descrito numerosas diferencias cinéticas entre especies, e incluso interraciales, lo que hace de la extrapolación de dosis una irracionalidad terapéutica a ser evitada (Nightingale, 1993; Prescott y col., 2002; Carretero y col., 2002).

1.2 Principios de la terapéutica

Para que un fármaco produzca sus efectos debe encontrarse en concentraciones adecuadas en el lugar de acción, situación que se ve fuertemente influenciada por la cantidad de fármaco administrada, grado y velocidad de absorción, distribución, unión o depósito a los tejidos, la biotransformación y excreción (Kamerling y Owens, 1994; Benet y col., 1996).

Para la mayoría de los fármacos existe una estrecha relación entre el efecto del fármaco y su concentración en sangre, en general, cuando mayores son las concentraciones en plasma, mayores son los efectos del fármaco, pero esto no es válido siempre, ya que hay algunos fármacos en los que su efectos perduran después de haber desaparecido de sangre o actúan antes de que lleguen a circulación general (Kamerling y Owens, 1994).

La farmacocinética tiene el objetivo de estudiar las velocidades de cambio de la concentración de fármacos y sus metabolitos en los fluidos biológicos, tejidos y excretas, así como también el de la respuesta farmacológica y la construcción de modelos adecuados para la interpretación de tales datos. Los avances en esta disciplina han llevado los conceptos farmacocinéticos al terreno práctico de la terapéutica,

creándose la farmacocinética clínica, cuyo objetivo es la aplicación de la farmacocinética a la seguridad y el manejo terapéutico adecuado y efectivo del paciente (Cid Cárcamo, 1982; Ritschel, 1994).

El estudio farmacocinético individual de un fármaco provee información para una correcta base terapéutica, ruta de administración e intervalo de dosis (Kamerling y Owens, 1994). La farmacocinética clínica juega su papel en el sistema dosis-eficacia, viendo de asegurar una relación más cuantitativa entre la dosis y la eficacia, y sirviendo de base para interpretar las concentraciones de fármacos en los líquidos biológicos (Benet y col., 1996).

Los datos cinéticos experimentales se interpretan a través de modelos basados en compartimentos. Éstos suponen al organismo dividido en diferentes compartimentos (fluidos, órganos, tejidos) unidos entre sí, a los que el fármaco distribuye luego de alcanzar la circulación general (Cid Cárcamo, 1982). El modelo abierto de un compartimiento es el más simple en el que existe un sentido unidireccional de entrada y salida del fármaco, este modelo supone al organismo como un todo homogéneo. También se describen modelos de 2 o más compartimentos, representados por tejidos u órganos constituyendo los compartimentos periféricos (adiposo, tegumento, hueso), tejidos donde el intercambio no se realiza a la misma velocidad. La sangre misma puede englobar dos compartimentos, uno la fracción proteica que fija rápidamente los medicamentos y otro el líquido plasmático (Cid Cárcamo, 1982; Gibaldi y Perrier, 1982; Martin-Jiménez y Riviere, 1998).

El modelo de 2 compartimentos, permite caracterizar de mejor forma observaciones experimentales que dan cuenta que la distribución del fármaco en los diferentes tejidos y fluidos del organismo que se producen a velocidades diferentes, constatando así un proceso observable de distribución (Arancibia, 1994; Riviere, 2011).

En el análisis no compartimental o modelo independiente, los puntos experimentales obtenidos no son explicados mediante un modelo matemático, este tratamiento de datos da medidas puntuales de lo que ocurre con el fármaco en una situación e individuo concreto y en un punto temporal concreto. Ambos tratamientos de datos, compartimental y no compartimental, son válidos y complementarios (Ritschel, 1994).

El modelo no compartimental, es independiente del efecto de estas variables, y a su vez los parámetros lo son respecto al número de compartimientos que se pudieran escoger en cada análisis (Kinabo y McKellar, 1989; Riviere, 2009).

Este modelo, describe el comportamiento del fármaco basándose en el tiempo promedio que una molécula permanece en un espacio cinéticamente homogéneo, un concepto idéntico a un compartimiento farmacocinético; más aún, en teoría, cualquier análisis "no compartimental" tiene un equivalente compartimental. Los datos que se analizan son típicamente perfiles de concentración séricas en el tiempo, lo que implica que al menos una estructura (central) del modelo compartimental existe, pues simplemente no hay manera de evitar ese supuesto (Riviere, 2011).

La diferencia con el modelo compartimental es que no se realiza ninguna inferencia específica sobre las características y estructura de esos espacios. De esta manera, al no existir los compartimientos no se los relaciona con alguna estructura anatómica en particular (tejidos u órganos) (Riviere, 2011).

Otra diferencia importante es que en vez de determinar las tasas de cambio en función de constantes de difusión o eliminación y semividas, los modelos no compartimentales describen los procesos farmacocinéticos en términos de momentos estadísticos. De esta manera las curvas de concentración plasmática frente al tiempo, se tratan como si fueran curvas de distribución estadísticas. En lugar de basarse en constantes de difusión entre compartimientos, los modelos no compartimentales se encuentran basados en funciones de densidad de probabilidad, las cuales definen el comportamiento del fármaco en términos de la probabilidad de que el mismo se encuentre en una localización en particular. Además se emplean ecuaciones integrales en vez de diferenciales, por lo que la metodología de cálculo es más sencilla (Kinabo y McKellar, 1989; Riviere, 2011).

Por otro lado, el grado de simplificación del modelo no compartimental, va en detrimento de la posibilidad de explicar ciertas actuaciones meramente farmacocinéticas, pues al no existir concepto de compartimiento, no existen las constantes de transferencia de fármacos entre los mismos (k_{10} , k_{12} , k_{21} para modelos bicompartimentales, e inclusive k_{13} y k_{31} para los tricompartmentales), así como tampoco las constantes asociadas a la distribución y eliminación (α y β , respectivamente) ni su respectivas semividas ($t_{1/2\alpha}$ y $t_{1/2\beta}$, respectivamente). De todas formas aunque estos parámetros son de utilidad para explicar un comportamiento

cinético más detallado, los parámetros del modelo no compartimental son suficientes como para dar respuestas a la gran mayoría del comportamiento cinético de los fármacos en el organismo especialmente los de mayor relevancia clínica (Kinabo y McKellar, 1989; Riviere, 2011).

Los parámetros a obtener de mayor importancia clínica (robustos) son la depuración o aclaramiento, volumen de distribución, semivida de eliminación y concentración efectiva (Kamerling y Owens, 1994).

El conocimiento de parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos que describen la disposición y efecto en animales, así como la variabilidad interindividual asociadas con estos parámetros y los factores fisiopatológicos que contribuyen a la variabilidad, son críticos para designar el régimen de dosis apropiado en los animales. El objetivo de la administración de un fármaco consiste en conseguir el efecto deseado, a la vez que se minimizan el riesgo y la toxicidad, y en el caso de los animales productores de alimentos, evitar la presencia de concentraciones de residuos en los tejidos o productos destinados a consumo humano o animal (Martin-Jiménez y Riviere, 1998).

Hay diferencias fisiológicas entre bovinos y búfalos mencionadas anteriormente, como son la composición corporal, porcentaje de tejido adiposo, ciclo reproductivos, metabolismo hepático, excreción renal, tasa metabólica, composición de la leche entre otros (Zapata, 2006). Es bien conocido que todos estos factores y en distintas magnitudes son factores que influyen en la disposición de los fármacos. Para establecer o cuantificar estas diferencias se recurre a estudios farmacocinéticos específicos, para así contar con parámetros cinéticos descriptivos de la disposición del fármaco en la especie y además entregar información que permitan efectuar cálculos de dosificación en torno a logro de la eficacia terapéutica (Prescott y col., 2002; Beltrán, 2004).

1.3 Características de las fluoroquinolonas

Las fluoroquinolonas son un grupo de antibacterianos sintéticos que despiertan alto interés tanto en medicina humana, como en medicina veterinaria (Ihrke y cols., 1999), fueron consideradas como el agente antimicrobiano ideal debido a su amplio espectro, propiedades farmacocinéticas clínicamente ventajosas y reducida toxicidad. Comparados con otros agentes antimicrobianos, las fluoroquinolonas presentan, además

de un amplio espectro, una buena absorción tras la administración oral, un alto volumen de distribución, penetrando en casi todos los tejidos y células del organismo y un tiempo de semivida prolongado, permitiendo regímenes posológicos con 1-2 administraciones al día (Walker y Dowling, 2006; Schentag, 2000). En solución, las fluoroquinolonas se comportan como bases débiles, su carácter lipofílico determina sus propiedades farmacocinéticas, presentan una adecuada biodisponibilidad por vía oral, intramuscular y subcutánea y se recomienda no administrar por vía oral en presencia de iones bivalentes en la dieta, pues reduce su absorción mediante quelación (Vancutsem y col., 1990; Ball y Tilloston, 1995; Appelbaum y Hunter, 2000; Bertino y Fish, 2000).

Las fluoroquinolonas son rápidamente acumuladas en células fagocíticas y no fagocíticas, se distribuyen en el citosol, donde logran alcanzar patógenos intracelulares como *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*. La concentración en macrófagos y neutrófilos, podría explicar la alta concentración de fluoroquinolonas en tejido infectado comparado con la concentración en tejido sano (Bertino y Fish, 2000).

La marbofloxacin es una fluoroquinolona desarrollada exclusivamente para uso veterinario cuya molécula es 9-fluoro- 2,3-dihidro- 3 metil- 10 (4-metil-1-piperacil)- 7-oxo- 7H pirido (3,2,1-ij) (4,1,2) benzoxadiacina- 6 ácido carboxílico. Presenta un anillo de oxadiazina, que se supone que confiere a la molécula ventajas farmacocinéticas como mayor tiempo de semivida y mayor volumen de distribución (Marín y col., 2007). En la práctica, estas características pueden permitir la administración cada 24 horas manteniendo concentraciones por encima de la CIM durante más de 12 horas (Haritova y col., 2006).

La marbofloxacin es un antimicrobiano bactericida, cuyo espectro abarca a la mayoría de las bacterias Gram (–) aerobias y algunas Gram (+) aerobias como estafilococos, alcanza altas concentraciones en la mayoría de los tejidos, incluso en el sistema nervioso central. Presenta un pKa de 5,5 y 8,2, con un punto isoeléctrico de 6,85. Su mecanismo de acción es inhibir a la ADN girasa, lo que lleva a la muerte de la célula bacteriana (Lode y col., 1998; Ball, 2000; Thomas y col., 2001; Hawkey, 2003).

Algunos autores señalan que, para el caso de bacterias gram negativas como *Escherichia coli* o *Neisseria gonorrhoeae*, la enzima diana principal es la ADN girasa o topoisomerasa II, mientras que en otras, como *Staphylococcus aureus* o

Streptococcus pneumoniae la enzima más sensible es la topoisomerasa IV (Thomas y col., 2001; Bebear y col., 2003).

La marbofloxacin se encuentra aprobada para uso en bovinos, porcinos, caninos y felinos. Es indicada para procesos respiratorios y diarreas neonatales en bovinos, síndrome mastitis-metritis-agalaxia e infecciones respiratorias en porcinos, afecciones dérmicas y heridas e infecciones urinarias (EMEA, 1996; Thomas y col., 1996; Thomas y col., 1998). Debido a sus buenas características cinéticas y de eficacia se ha generalizado en la práctica clínica del veterinario su indicación extra rótulo o uso no contemplado en otras especies como así también exóticas o salvajes.

Diversos autores han estudiado la influencia del desarrollo en la farmacocinética de las quinolonas en diversas especies domésticas (Baroni y col., 2007), encontrándose, en algunos casos, diferencias significativas en algunos parámetros farmacocinéticos entre los grupos de distintas edades (Thomas y col., 1994; Aminimanizani y col., 2001; Rodvold y Neuhauser, 2001; Waxman y col., 2001; Carretero y col., 2002).

1.4 La edad y la disposición de los fármacos

El comportamiento cinético de los fármacos puede verse afectado por una serie de factores que dependen de la edad, el desarrollo postnatal, así como los cambios relacionados con el envejecimiento, los que pueden influir en la absorción, distribución, metabolismo y excreción de los fármacos (Ritschel, 1992; Riviere, 1997; Prescott y col., 2002)

La vía oral es la que muestra mayor variabilidad conforme al grado de desarrollo anatómico, el área de absorción de la mucosa gastrointestinal, el flujo sanguíneo regional, el pH gástrico, la motilidad gastrointestinal, la población microbiana y la alimentación de los neonatos, siendo estos últimos los factores que más influyen en el proceso de absorción oral. Una función ruminal equivalente a la de un adulto se obtendría a partir de las 8 a 12 semanas, aproximadamente (Thomas y col., 1994; De Backer, 1986; Aliabadi y Lees, 2002).

La evolución postnatal de la composición del organismo puede llevar a importantes variaciones en la distribución de los fármacos. Con la edad, el agua corporal total y la

masa muscular van disminuyendo, mientras que la proporción de grasa va en aumento, y por lo tanto, los fármacos hidrosolubles pueden presentar un menor volumen de distribución en los individuos viejos, y los más liposolubles, uno mayor. El volumen de distribución depende entonces, entre otros factores, de la proporción de agua corporal, de la cantidad de tejido adiposo, de la unión a proteínas plasmáticas y tisulares, del gasto cardíaco y flujo sanguíneo regional, de la permeabilidad de ciertas barreras (Ritschel, 1992), y en el caso de los rumiantes, del grado de desarrollo de los proventrículos (Nows, 1992; Thomas y col., 1994).

En rumiantes, la diferencia en el volumen de los proventrículos, debido a los distintos grados de desarrollo de los mismos, es otro factor que puede modificar ampliamente el volumen de distribución de las quinolonas (Vancutsem y col., 1990).

La excreción de los fármacos puede verse influida, entre otras cosas, por el grado de madurez renal al nacimiento. La función renal en los mamíferos recién nacidos no está completamente desarrollada, lo que puede llevar a una reducción de la excreción renal de los fármacos. El grado de maduración de la función renal al momento de nacer varía de acuerdo a las especies. Los rumiantes poseen una función renal mucho más desarrollada al nacimiento que la de otros mamíferos (Ritschel, 1992; Thomas y col., 1994).

En los rumiantes, la alimentación varía progresivamente, desde una dieta exclusivamente láctea, que produce valores de pH urinario ligeramente ácido, a una dieta a base de forraje y pienso en los adultos, que produce una orina netamente alcalina. La reabsorción tubular, pH dependiente, ha sido demostrada para la mayoría de las quinolonas, por lo que dichas variaciones de pH pueden modificar la eliminación de las mismas (Thomas y col., 1994; Thomas y col., 1997).

La velocidad de maduración de la función hepática tampoco es igual para todas las especies y varía, a su vez, dentro de una misma especie, en función del fármaco y la ruta metabólica en cuestión. En los neonatos, la actividad metabólica es generalmente baja, la funcionalidad hepática no está completamente desarrollada, lo que afectaría el proceso de metabolización de ciertos fármacos. El desarrollo de la actividad metabólica hepática se alcanza entre la primera y la segunda semana en el caballo y entre la primera y la tercera en roedores. En el perro y los rumiantes el proceso lleva entre tres y cinco semanas y en cerdos y seres humanos es más prolongado (cuatro a doce semanas). En

general, en el momento del nacimiento, el sistema oxidasa dependiente del citocromo P-450 y el sistema de conjugación con ácido glucurónico son deficientes en los mamíferos. Sin embargo, otros pasos metabólicos, como la acetilación, conjugación con glicina o sulfato, están desarrollados en los neonatos (Ritschel, 1992; Thomas y col., 1994; De Backer, 1986). Tras la administración de marbofloxacin en animales jóvenes, Thomas y col. (1994) encontraron que la capacidad de eliminación es menor en terneros pre rumiantes de tres semanas que en los animales adultos, aumentando el aclaramiento de 0,15 a 0,31 L/h·kg durante el periodo estudiado. De la misma forma en cabras de una semana de edad presentan un aclaramiento de 0.08 L/h·kg a diferencia del adulto que describe 0.18 L/h·kg (Waxman y col., 2004).

El proceso de absorción se ve fuertemente afectado por el desarrollo anatómico, la superficie de absorción de la mucosa gastrointestinal, el flujo sanguíneo regional, el pH gástrico, la motilidad gastrointestinal, la población microbiana y la alimentación de los neonatos. Lo anterior hace que exista una gran diferencia en la absorción de los fármacos entre los recién nacidos y los adultos (Baggot, 2001).

Desde el punto de vista anatómico, al nacimiento, en terneros se encuentran presentes todas las estructuras del tracto digestivo de los rumiantes adultos, aunque en estado juvenil de desarrollo. Los proventrículos son relativamente a funcionales y están menos desarrollados en comparación con el abomaso. El rumen presenta la tasa de crecimiento más rápida, seguida por retículo, omaso y abomaso, en este orden. Aproximadamente a las doce semanas de vida, en terneros, la proporción relativa de las cuatro estructuras alcanza los valores del adulto (De Backer y Bogaert, 1983). El desarrollo funcional del rumen ha sido dividido en tres periodos: la fase no rumiante, hasta la tercera semana de edad, la fase de transición, entre las tres y las ocho semanas y la fase adulta, desde las ocho semanas. También existen diferencias en el proceso de desarrollo anatómico retículo ruminal entre terneros alimentados con leche y terneros alimentados con forraje. El aumento de volumen del rumen lleva a un aumento de la superficie de absorción por el desarrollo de las papilas. En terneros recién nacidos, las papilas rumino-reticulares miden menos de 1 mm, pero con la ingestión de alimento sólido alcanzan el tamaño del adulto en ocho semanas. El desarrollo de las papilas, con su respectivo aporte sanguíneo y linfático, aumenta considerablemente la absorción de sustancias a este nivel (De Backer y Bogaert, 1983).

Los cambios en el pH del tracto gastrointestinal afectan la difusión no iónica de ciertos fármacos. En animales adultos, el pH ruminal se encuentra entre 5,6 y 6,5, mientras que terneros de tres semanas de edad presentan un pH rumino - reticular de 6 a 8. El pH abomasal es de 7,5 al nacimiento, pero desciende a 4 en pocas horas con la ingestión de calostro o leche. En las siguientes dos semanas de vida, con el aumento de actividad de la pepsina el pH desciende a 2 con aumentos temporales durante la ingestión de sustitutos lácteos. Al ir cambiando a una dieta sólida, el pH promedio del abomaso pasa a ser de 3,6 mientras que el pH abomasal del adulto es de 2 a 3 (De Backer, 1986).

Otro determinante del proceso de absorción de los fármacos es el desarrollo de la motilidad gastrointestinal. En terneros, no se producen movimientos de los proventrículos durante las dos primeras semanas de vida. A las tres semanas comienza una leve motilidad del retículo seguido por un lento movimiento del rumen. A partir de la sexta semana, en terneros alimentados con forraje, se aprecia la contracción bifásica del retículo y un fuerte movimiento ruminal (De Backer y Bogaert, 1983). Esta falta de actividad propulsiva en el neonato afecta el tránsito de los fármacos administrados por vía oral y produce un retraso en la absorción de los mismos (Nowis, 1992).

La constitución de la población microbiana en los proventrículos durante las primeras semanas de vida, puede también influir en la absorción. Algunos fármacos pueden ser metabolizados por la flora intestinal y, por otro lado, la escasez de aceptores de hidrógeno, debido a las fermentaciones anaeróbicas en el rumen, puede favorecer la reducción de las sustancias administradas por vía oral. Todo esto daría como resultado una importante eliminación presistémica de los fármacos (Baggot y Short, 1984; Baggot 2001).

Por otro lado, la edad puede condicionar la dieta ingerida y de esta manera influir en la absorción oral de algunos fármacos. En terneros, se observó una disminución de la biodisponibilidad de tetraciclinas, penicilinas, cloranfenicol y trimetoprim, tras una alimentación láctea (Baggot, 2001). Para el caso de las quinolonas, esto puede ocurrir, debido a la quelación con cationes multivalentes, como el calcio contenido en la leche y los sustitutos lácteos (Vancutsem y col., 1990).

Debido a que la proporción de agua es más alta en el neonato que en el adulto, los fármacos más hidrosolubles y que presentan una baja tasa de unión a proteínas plasmáticas, tendrán un volumen de distribución mayor en los neonatos. Esto, sin

embargo, no es tan claro para fármacos liposolubles como las quinolonas (De Backer, 1986). El agua corporal total representa entre un 70 a un 75 % del peso corporal en el neonato, mientras que en el adulto es sólo un 50 a 60 %. La proporción de tejido graso en los animales jóvenes es menor que en los adultos (Nows, 1992), lo que puede influir en la distribución de fármacos liposolubles.

La unión de los fármacos a las proteínas del plasma depende, entre otros factores, de la cantidad de proteínas disponibles, entonces, teniendo en cuenta que la concentración de éstas en el recién nacido suele ser baja, fundamentalmente la fracción de albúminas, en neonatos, podría observarse una menor unión a proteínas y, en consecuencia, un mayor volumen de distribución, sobre todo de aquellos fármacos que presentan una tasa alta de unión a proteínas plasmáticas (De Backer, 1986).

Finalmente la excreción de los fármacos puede verse también influida por el grado de madurez renal al nacimiento, aunque el desarrollo de la filtración glomerular tras el nacimiento se produce muy rápidamente en los rumiantes, completándose en sólo uno a tres días (Nows, 1992).

Como resultado, el aclaramiento de fármacos que se eliminan principalmente por filtración glomerular alcanza valores de adultos en los primeros días de vida en los rumiantes. Además en los terneros, la función de secreción tubular está completamente desarrollada uno a tres días después del nacimiento (De Backer, 1986).

Otro factor para destacar es el cambio de la dieta relacionado con la edad, lo cual produce variaciones en el pH urinario que pueden alterar la eliminación renal de los fármacos. En los rumiantes, la alimentación varía, progresivamente, desde una dieta exclusivamente láctea, que produce valores de pH urinario ligeramente ácidos, a una dieta a base de forraje en los adultos, que produce una orina netamente alcalina. La reabsorción tubular pH dependiente ha sido demostrada para la mayoría de las quinolonas (Sörgel y Kinzig, 1993), por lo que dichas variaciones de pH pueden modificar la eliminación de las mismas.

1.5 Eficacia terapéutica, índices PK/PD

A las dosis apropiadas, las fluoroquinolonas son bactericidas, presentando un patrón concentración dependiente y un prolongado efecto postantibiótico (Walker y Dowling, 2006). El conocimiento y monitorización de estos antimicrobianos, especialmente sus características farmacocinéticas y farmacodinámicas frente a patógenos determinados, permite optimizar el régimen de dosificación, para evitar la aparición de mutantes resistentes y conseguir el éxito clínico (Aminimanizani y col., 2001).

La resistencia a los medicamentos antimicrobianos es un problema importante que desafía a los médicos veterinarios para proporcionar tratamientos eficaces sin cooperar en la selección de cepas resistentes que puedan luego afectar a otros animales, personas y el medio ambiente. Uno de los factores que contribuyen a la selección de la resistencia es la exposición a concentraciones de antimicrobianos inadecuada durante el tratamiento. Cuando se dosifica con antibióticos se debe asegurar que se logren concentraciones adecuadas para eliminar cepas sensibles; esto sin embargo selecciona cepas resistentes, que pueden multiplicarse y provocar la recaída del animal. Por lo tanto, se han desarrollado estrategias para administrar antibióticos a los animales usando regímenes de dosificación apropiados a partir de los índices de eficacia PK/PD (Toutain y col., 2002; Toutain y Lees, 2004; Shidhu y col., 2010).

Para asegurar la cura microbiológica (y no solo cura clínica) del animal, las concentraciones del antibiótico deben estar por sobre las concentraciones mínimas inhibitorias de la bacteria según se indique para los antimicrobianos tiempo dependiente o concentración dependiente, siendo para estos últimos las veces que se supere el valor de CIM. Esto se asume como lógico pero las variaciones en los valores de C_{max} y AUC, como así también los valores de CIM, hacen que esquemas rígidos no sean siempre efectivos, es por ello que la eficacia antimicrobiana se alcanza con la interacción de parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos PK/PD, habiendo ya muchos estudios que así lo avalan como ser los de Craig (1998), Shojaee y Lee (2000), Nicolau (2003), McKellar y col. (2004), Toutain y Lees (2004) los que han sentado las bases de la actual antibióticoterapia.

Como se vio más arriba, algunos parámetros farmacocinéticos se pueden correlacionar con parámetros farmacodinámicos, en caso de los antibióticos, es con la concentración inhibitoria mínima (CIM), con ellos se obtienen predictores más robustos de eficacia

terapéutica. De esta integración surgen algunos parámetros que resultan de gran utilidad en terapéutica antimicrobiana. Uno de los parámetros más utilizados es el área bajo la curva (AUC) dividida por la concentración inhibitoria mínima (CIM), hay ciertas familias de antibióticos que responden mejor a este modelo farmacodinámico entre ellos están los aminoglucósidos y las fluoroquinolonas, como fármacos concentración dependientes, en cambio la relación AUC/CIM también se aplica a otros fármacos de carácter bacteriostático como tetraciclinas, macrólidos y sulfamidas, en cambio las tiempo dependientes como los beta-lactámicos aplica el $T > CIM$ (Papich, 2014). Estos parámetros son actualmente considerados como determinantes de la eficacia “in vivo” de los agentes antimicrobianos. Esta relación AUC/CIM mide la exposición total de la bacteria frente a un antimicrobiano, es una combinación de la concentración máxima del antimicrobiano con el tiempo de exposición a niveles sobre la CIM. Esta relación es dependiente de la C_{max} del antibiótico y es importante también para fármacos con una semivida larga (Shojaee y Lee, 2000; Mouton y col., 2002; Toutain y col., 2002; Papich 2014).

El índice de eficacia terapéutica C_{max}/CIM se expresa como un cociente, el término final es sin unidades. El C_{max} se toma directamente de los datos de la curva de concentración en función del tiempo para toda aquella vía de administración que no sea la endovenosa. El índice que aplica el área bajo la curva (AUC) AUC/CIM, su unidad se expresa en horas, si bien algunos autores también las describen sin unidad. Cuando se utiliza AUC/CIM, se da por entendido que es las AUC durante un intervalo de 24 h (Toutain y col., 2002; Sidhu y col., 2010).

Pero, si el intervalo de dosis en el estado estacionario es más breve que 24 horas, el AUC de dosis única no es equivalente a las AUC durante un intervalo de 24 h. Si el intervalo de dosis es de más de 24 horas (por ejemplo, cada 48 o 72 h) es indiferente si desea utilizar un área parcial o el área hasta el infinito. La mayoría de los investigadores utilizan el AUC para el intervalo cubierto por la actividad del agente (por ejemplo, 48 h, 72 h, etc), inicialmente si es en estado estacionario se usa el AUC a 24 h como T_{last} , si es dosis única se usa a infinito pero dentro del tiempo 24 h. El término AUIC (área bajo la curva inhibitoria) se ha utilizado por algunos autores como sinónimo de AUC/CIM. Sin embargo, ha habido por lo menos tres interpretaciones diferentes de AUIC. Una definición de AUIC es que representa las AUC sólo por el período de tiempo que la concentración está por encima de la CIM. También ha sido definido como equivalente a

la AUC_{total}/CIM . Si la concentración está por encima de la CIM a lo largo de la mayor parte del intervalo de 24 h, hay poca diferencia entre estas dos definiciones. Sin embargo, para evitar confusiones, el término AUC/CIM debe utilizarse en lugar de $AUIC$ (Toutain y col., 2004).

Shojaee y Lee (2000) establecen que una dosis optima de cualquier antibiótico, debería mantener una concentración en el lugar de infección por sobre el CIM durante el periodo completo de medicación, actuando primariamente por mecanismos dependientes del tiempo. Por otro lado los valores de AUC/CIM y C_{max}/CIM deben ser de al menos 100 h y 8 respectivamente, siendo éstos concentración dependiente. En cambio Walker (2000) y Toutain y col. (2002), sugieren que el punto de quiebre crítico para determinar la eficacia terapéutica de fluoroquinolonas es un $C_{max}/CIM_{90} \geq 10$, $AUC_{0-24}/CIM_{90} \geq 120$ h. Para este último, Wright y col. (2000), establece que para los G+ ese valor debe ser al menos de 30 horas.

Al revisar la literatura se detecta que no se publican trabajos en búfalos que describan la disposición de marbofloxacin en los primeros 50 días de vida, por lo que sin un estudio científico del comportamiento cinético del fármaco ni bien va madurando su organismo, no es posible determinar claros esquemas de dosificación ni sus vías de administración, siendo su terapéutica hoy empírica.

2. HIPÓTESIS

La disposición de marbofloxacin sufre modificaciones significativas dentro de los primeros 50 días de vida de los búfalos de agua.

3. OBJETIVOS

General:

- Describir y comparar la disposición de marbofloxacin administrada por distintas vías dentro los primeros 50 días de vida, proponiendo un régimen de dosificación mediante parámetros cinéticos y farmacodinámicos.

Específicos:

- Estandarizar y validar un método cromatográfico para la determinación de las concentraciones séricas de marbofloxacin.

- Calcular y comparar los distintos parámetros cinéticos robustos descriptivos de la disposición del fármaco administrado a por distintas vías y a diferentes edades.

- Corroborar la eficacia terapéutica a la dosis de estudio a través de los índices de eficacia de la relación PK/PD frente a los posibles patógenos que pueden afectar a la especie.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Material farmacológico

- Marbofloxacin droga pura 98%, suministrada por Sigma Chemical CO.
- Marbofloxacin comercial: Laboratorio Vétoquinol, Lure, Francia.
 - Marbocyl® inyectable al 10%.
 - Marbocyl® bolus 50 mg.
- Ofloxacin: como patrón interno en la técnica cromatográfica, suministrada por Sigma Chemical CO, lote 038K1555.

4.2 Material biológico

Para el estudio se utilizaron 80 bubalinos clínicamente sanos de distintos predios ganaderos de la provincia de Corrientes.

4.3 Método

4.3.1 Grupos experimentales:

a- Estudio de la vía endovenosa (2mg/kg)

<u>Grupo 1:</u>	Estudio del comportamiento farmacocinético de la marbofloxacin en 8 búfalos de 2 - 3 días de edad.
<u>Grupo 2:</u>	Estudio del comportamiento farmacocinético de la marbofloxacin en 8 búfalos de 7-10 días de edad.
<u>Grupo 3:</u>	Estudio del comportamiento farmacocinético de la marbofloxacin en 8 búfalos de 20 - 21 días de edad.
<u>Grupo 4:</u>	Estudio del comportamiento farmacocinético de la marbofloxacin en 8 búfalos de 50 días de edad.

b- Estudio de la vía intramuscular y subcutánea (2mg/kg)

Grupo 5: Estudio del comportamiento farmacocinético de la marbofloxacin en 8 búfalos de 7 - 10 días de edad, tras administración intramuscular.

Grupo 6: Estudio del comportamiento farmacocinético de la marbofloxacin en 8 búfalos de 7 - 10 días de edad, tras administración subcutánea.

c - Estudio por la vía oral (2,5 mg/kg)

Grupo 7: Estudio del comportamiento farmacocinético de la marbofloxacin en 8 búfalos de 2 – 3 días de edad.

Grupo 8: Estudio del comportamiento farmacocinético de la marbofloxacin en 8 búfalos de 7-10 días de edad.

Grupo 9: Estudio del comportamiento farmacocinético de la marbofloxacin en 8 búfalos de 20 - 21 días de edad.

Grupo 10: Estudio del comportamiento farmacocinético de la marbofloxacin en 8 búfalos de 50 días de edad.

4.3.2 Diseño y Condiciones experimentales

El diseño del estudio corresponde a un ensayo clínico paralelo. Los bubalinos fueron controlados pos parto y registrados mediante número de otocrotal de la madre, fueron asignados al azar a los estudios de vía y edad para luego ser sometidos a estudio cinético según registro de asignación, con la precaución de uniformidad de pesos y sexo en cada grupo de muestreo estratificado. Previo al ensayo los bubalinos fueron pesados y dejados atados en el corral durante la primeras 2 h del ensayo junto a sus madres para facilitar la toma de muestras, luego permanecen en el corral libre junto a sus madres.

4.3.3 Toma de muestra

Las muestras se tomaron de la vena yugular a los siguientes tiempos 0, 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480, 600, 720, 1440 y 2880 minutos post administración. Las muestras de sangre fueron colocadas en tubo de vidrio sin aditivos y protegidos de la luz, una vez coagulada fueron centrifugadas para obtener el suero que se colocó en viales de 2 mL. Las muestras fueron congeladas (-20 °C) hasta su procesamiento en el laboratorio para determinar las concentraciones séricas de marbofloxacin, no más allá de los 2 meses de tomadas las muestras en terreno.

4.3.4 Determinación de las concentraciones séricas por HPLC

Las concentraciones de marbofloxacin se determinaron mediante HPLC/uv. Marbofloxacin droga pura y ofloxacin, utilizada como estándar interno, ambas fueron adquiridas de Sigma Chemical Co.. St Louis, MO, USA). El HPLC es un Thermo separation Products. Bomba (Spectra series P100). Inyector automático (Spectra SERIES AS- 1000). Detector ultravioleta (Spectra series UV 100). Datajet integrator (Thermo separation products). Precolumna Kromasil C18 5U 15 x 4,6 mm (Scharlab S.L.). Columna Kromasil 100 C18 5 µm 15 x 0,46 cm (Scharlab S.L.). La separación se realizó operando a temperatura ambiente ($\cong$ 24°C). La fase móvil se compuso de metanol:acetonitrilo:ácido acético:triethylamina (74:20:4:1:1, v/v/v/v/v), llevado a pH 2.7 con solución acuosa de sulfato de tetrabutylamonio al 4%. La longitud de onda para la detección fue fijada en 295 nm y a una velocidad de flujo de 0.6 mL/min. Un volumen de 300 µL de las muestras de suero se colocaron en tubos de 15 mL, a los que se les agrega 75 µL de solución de estándar interno (ofloxacin 5 µg/mL en ácido fórmico 0.1 N) y 45 mL trichlorometano. El tubo es agitado durante 10 minutos en agitador horizontal, luego es centrifugado a 3200 g por 7 minutos. La fase orgánica es removida y evaporada por corriente de nitrógenos a 40 °C. La muestra es re disuelta con 150 µL de fase móvil y una alícuota de 50 µL es inyectada al HPLC para su elución.

La recta de calibración se calculó mediante el cociente del área bajo la curva cromatográfica de distintas concentraciones de marbofloxacin sobre el área bajo la

curva cromatográfica de una concentración fija de patrón interno, ofloxacin (AUC_m/AUC_o). A partir de dicha relación y por medio de una regresión lineal se construyeron las rectas de calibración cuyas ecuaciones se utilizaron, posteriormente para conocer las concentraciones de marbofloxacin (AUC_m/AUC_o), presentes en las muestras problema. Se realizó una recta de calibración para las concentraciones más bajas y otra que define las concentraciones más altas. Estas rectas se realizaron mediante el análisis de las siguientes concentraciones en suero con un intervalo de 0,025 a 1 µg/mL (0,025; 0,05; 0,1; 1) para la primera recta y un intervalo de 1 a 15 µg/mL (1; 2,5; 5; 10; 15) para la segunda recta. El suero con los fármacos a las diferentes concentraciones, llevaba también el patrón interno (ofloxacin). Para la validación del método analítico se utilizaron los siguientes criterios:

-Linealidad:

Las soluciones fueron preparadas cada día por sextuplicado y cada solución inyectada por duplicado, determinándose el área bajo la curva cromatográfica (AUC) media y la desviación estándar para cada concentración (fueron utilizadas al menos 2 curvas por día, durante 3 días distintos, 6 determinaciones de cada concentración). Los resultados fueron procesados mediante regresión lineal obteniéndose una ecuación que define la relación existente entre las distintas concentraciones ensayadas y la respuesta observada (AUC).

-Precisión, exactitud:

La precisión refleja la proximidad entre las diferentes medidas individuales de una misma concentración. Se describe por el coeficiente de variación, por lo tanto:

$$\text{Precisión (\%)} = (\text{DE}/\text{media}) \times 100$$

Donde DE es la desviación estándar.

Se determinó para cada concentración dentro del mismo día (repetibilidad) y en distintos días (reproducibilidad) siguiendo el mismo método. Se considera que para

cada nivel de concentración estos valores no deben ser superiores al 15 %, excepto para el límite de cuantificación que puede ser de hasta el 20 %.

La exactitud, en cambio, describe la proximidad de los resultados obtenidos a partir del método analítico respecto del valor verdadero, como ser:

$$\text{Exactitud (\%)} = (\text{Concentración experimental} / \text{Concentración teórica}) \times 100.$$

El valor de este criterio debe encontrarse en un valor entre 80-120%. En ambas metodologías los coeficientes de variación tanto intra-día como inter-día se calcularon para cuatro concentraciones distintas, que fueron analizadas por triplicado (intra-día), tres días distintos (inter-día).

-El límite de detección:

El límite de detección indica la mínima concentración del fármaco analizado que puede ser detectada con el método analítico utilizado. Se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$LD = k * DE / m$$

Donde LD es el límite de detección; k es la constante que indica el margen de seguridad y es igual a 3; DE es la desviación estándar de las muestras blanco; m es la pendiente de la recta de calibración.

-Límite de cuantificación (sensibilidad):

Se corresponde con la concentración más baja que puede cuantificarse empleando el método validado. Es aquel identificable y reproducible con una precisión menor de 20 % y una exactitud de 80-120 %.

-Reproducibilidad del método analítico:

La reproducibilidad del método analítico se determinó a partir de los coeficientes de variación inter-día e intra-día. Para ello se utilizaron los valores de área bajo la curva cromatográfica (AUC) de cuatro concentraciones distintas (0,25; 0,1; 1 y 10 $\mu\text{g/mL}$). Para el cálculo del coeficiente de variación intra-día se tuvo en cuenta la variación entre los valores hallados para una misma concentración en un mismo día a intervalos de 8 horas de diferencia y estas mediciones se repitieron durante tres días diferentes. El coeficiente de variación inter-día se calculó a partir de los valores de AUC para cada una de las concentraciones durante 3 días distintos.

-Recuperación:

La recuperación del método extractivo se calculó con las áreas bajo la curva de ocho concentraciones distintas (0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2; 5 $\mu\text{g/mL}$). Se utilizaron 6 mediciones de cada concentración realizadas en días diferentes mediante la adición al suero de un pequeño volumen ($<4\%$) de distintas soluciones de marbofloxacin que permitan lograr dichas concentraciones. Los porcentajes medios de recuperación y su error estándar fueron calculados por comparación de las AUC obtenidas tras la extracción de marbofloxacin a partir del suero y las AUC que correspondían a cada concentración de acuerdo a las ecuaciones de las rectas de linealidad de los fármacos en ácido fórmico 0.1 N. Estos valores se determinaron sólo para establecer la recuperabilidad de nuestro método extractivo y no para el cálculo de las concentraciones, ya que las rectas de calibración utilizadas para dicho cálculo fueron confeccionadas en suero y, por lo tanto, no fue necesario corregir los resultados con el valor de la recuperación. La estabilidad de los fármacos fue ensayada mediante muestras congeladas a -20°C durante 2 meses a tres concentraciones distintas de 0,05; 1 y 5 $\mu\text{g/mL}$.

4.3.5 Cálculo de los parámetros farmacocinéticos.

Las concentraciones séricas de marbofloxacin en función del tiempo fue analizado bajo un modelo no compartimental mediante el programa farmacocinético PK Solution 2.0 (Summit Research Service, Ashland, OH, USA).

Todos los valores de las concentraciones plasmáticas obtenidos de cada animal se procesaron y se ajustaron de forma individual y posteriormente, se procedió al cálculo de la media de los parámetros farmacocinéticos entre los individuos que conformaban cada uno de los grupos de ensayos realizados.

4.3.6 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

Los valores de CIM se determinaron utilizando una técnica de dilución en agar. Dos cepas de referencia, *Staphylococcus aureus* (S. aureus) ATCC 29213 y *E. coli* ATCC 25922, fueron incluidas en cada placa de prueba como controles, como se describe en las recomendaciones de procedimiento del Comité Nacional de Estándares de Laboratorios Clínicos (NCCLS 2002 y 2006) (Acar y Goldstein, 1996). Las bacterias analizadas fueron aisladas de muestras clínicas, de bovinos jóvenes y adultos de predios lecheros. Los inóculos variaron de 10^3 a $1 \times 1 \times 10^5$ unidades formadoras de colonias (UFC) por punto. Iso-Sensitest agar (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) fue utilizado como el medio de crecimiento estándar. Concentraciones de marbofloxacin en las placas fueron de 0,004 hasta 4 µg/mL. Las placas se leyeron después de la incubación durante 18-24 horas a 37 °C. La CIM se registró como la concentración más baja de marbofloxacin que inhibió el crecimiento de las cepas bacterianas, como se determina visualmente, la presencia de 1 o 2 colonias se consideran como resultados negativos. El ensayo se realizó por cuadruplicado. Las cepas sometidas a estudio fueron 14 cepas de *E. coli*, 10 de *Shigella spp.*, 18 de *S. aureus*, 12 de *K. pneumoniae*, 16 de *Salmonella spp* y 9 de *P. aeruginosa*.

4.3.7 Índices de Eficacia, relación PK/PD y cálculo de dosis efectiva

Para calcular los índices de eficacia terapéutica se consideraron:

- $C_{\max}/CIM_{90}$: Relación entre la concentración plasmática máxima ($C_{\max}$) y la concentración mínima inhibitoria (CIM_{90}). Se sugiere un valor de eficacia ≥ 12 .
- AUC/CIM_{90} : Relación entre el área bajo la curva concentración-tiempo y la concentración mínima inhibitoria (CIM_{90}). Se sugiere valor de eficacia ≥ 125 horas.

La dosis efectiva de marbofloxacin, se calculó usando la ecuación propuesta por McKellar y col. (2004):

$$\text{Dosis efectiva} = (AUC_{0-t} / CIM_{90} \cdot Cl_t \cdot CIM_{90}) / F$$

Donde AUC_{0-t} , área bajo la curva, CIM_{90} concentración inhibitoria mínima 90, Cl_t es el aclaramiento total, F biodisponibilidad.

4.4 Análisis estadístico

La comparación de los distintos parámetros farmacocinéticos robustos y descriptivos de la disposición de los fármacos a diferentes edades se realizó previo análisis exploratorio evaluando el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Los supuestos de normalidad se verificaron mediante la prueba de Shapiro-Wilks y de Kolmogorov Smirnov con la corrección de Lilliefors, en cambio la homocedasticidad de la varianza se verificó mediante el estadístico de Levene. Se realizó un análisis de varianza de una vía y el test de Tuckey como posttest. El análisis se realizó mediante el programa estadístico SPSS®, la significancia se fijó a un 5%. Los resultados se presentaran como media $\pm$ desviación estándar.

5. RESULTADOS

5.1 Validación de técnica HPLC para la cuantificación de marbofloxacin en suero

El tiempo de retención fue de $6,66 \pm 0,08$ minutos para la marbofloxacin y de $8,15 \pm 0,12$ minutos para la ofloxacin. La recuperabilidad de marbofloxacin en suero fue del $93,8 \pm 3,8$ %. La curva fue lineal entre las concentraciones de 0.017 y 15 $\mu\text{g/mL}$ (R^2 0.989). La precisión y exactitud del límite de cuantificación fue de $8,09 \pm 0,02\%$ y $94,88 \pm 13,63\%$ respectivamente, siendo el límite de cuantificación obtenido de 0,025 $\mu\text{g/mL}$. La repetitividad entre e intra ensayo fue de $5,4 \pm 2,1\%$ y $3,58 \pm 1,83\%$ respectivamente.

5.2 Farmacocinética de marbofloxacin tras la administración endovenosa a distintas edades

En la figura 1 se puede apreciar la disposición de marbofloxacin en función del tiempo para búfalos a diferentes edades, se aprecia un rápida distribución tisular, para luego entrar en una fase de eliminación constante que deja observar diferencias según la edad y se evidencian posteriormente en su parámetros farmacocinéticos expuestos en la tabla 1.

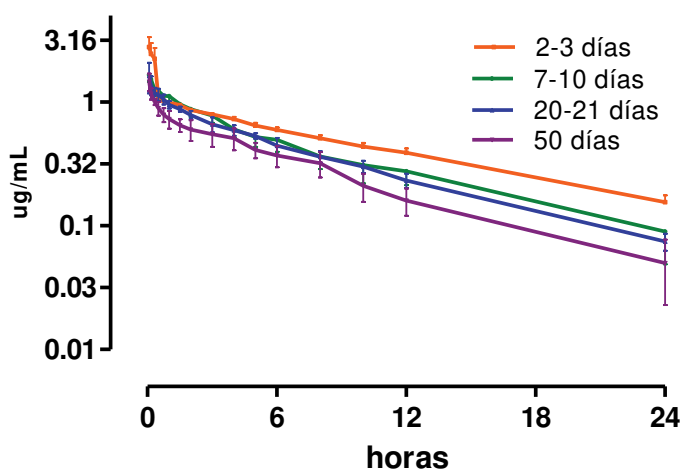


Figura 1: Curva semilogarítmica de concentración en función del tiempo de marbofloxacin ($X \pm D.E.$) administrado por vía endovenosa (2 mg/kg) a búfalos de diferentes edades dentro de su primeros 50 días de vida.

Los parámetros cinéticos que están sujetos a variación significativa entre las edades son la semivida biológica ($t_{1/2\lambda}$), área bajo la curva ($AUC_{(0-t)}$), volumen de distribución en estado de equilibrio (V_{ss}) y el aclaramiento total (CL_t). Teniendo clara relación en la permanencia del fármaco en el organismo, su distribución tisular y la cantidad del mismo en el organismo tras la administración de marbofloxacin a una dosis única de 2 mg/kg.

Tabla 1: Parámetros farmacocinéticos de marbofloxacin administrada por vía endovenosa (2 mg/kg) en búfalos a diferentes edades dentro de sus primeros 50 días de vida.

Parámetros cinéticos		Endovenoso							
		2-3 días		7 - 10 días		20 - 21 días		50 días	
		X	D.E.	X	D.E.	X	D.E.	X	D.E.
peso	kg	37,60	2,97	49,40	3,78	54,20	3,03	108,80	16,63
$t_{1/2\lambda}$	h	8,39 ^a	2,74	5,27 ^b	2,76	6,33 ^{ab}	0,99	6,72 ^{ab}	1,07
$t_{1/2\alpha}$	h	0,34	0,42	0,28	0,19	0,14	0,09	0,26	0,13
$C_{(0)}$	µg/mL	3,05	2,87	1,99	0,68	1,87	0,61	1,58	0,19
$AUC_{(0-t)}$	µg·h/mL	11,63 ^a	4,07	8,91 ^{ab}	3,65	8,14 ^b	0,91	7,22 ^b	1,40
AUC_{∞}	µg·h/mL	13,84	5,96	9,77	4,72	9,14	0,74	7,30	1,42
MRT	h	11,54	3,61	7,97	4,40	9,04	1,46	8,81	1,27
V_d	L/kg	1,80	0,17	1,66	0,60	2,00	0,23	2,73	0,69
V_{ss}	L/kg	1,77 ^a	0,36	1,70 ^a	0,50	2,00 ^{ab}	0,24	2,45 ^b	0,50
CL_t	L/kg·h	0,17 ^a	0,06	0,25 ^{ab}	0,12	0,22 ^{ab}	0,02	0,28 ^b	0,06

Letras distintas P<0.05

Si observamos la figura 2, podemos describir el comportamiento de la semivida biológica de marbofloxacin es menor a los 7-10 días de edad siendo significativa su diferencia con los primeros días de vida, la semivida se estabiliza a partir de los 20 días de edad no presentando diferencias con la primer semana de vida.

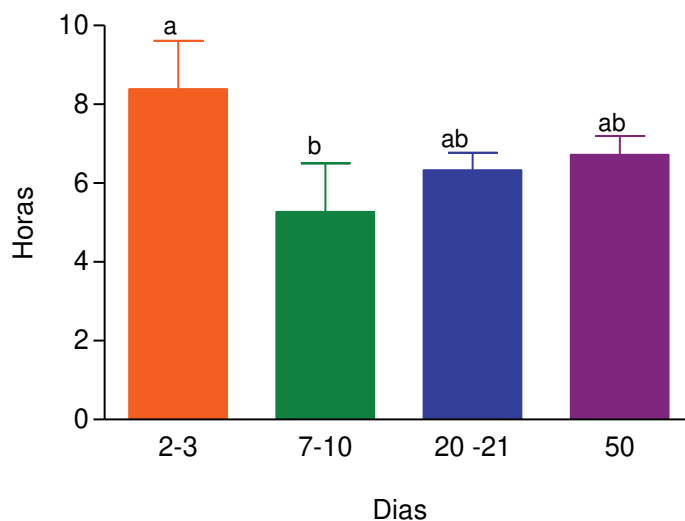


Figura 2: Valores promedio de la semivida de eliminación ($t_{1/2\lambda}$) $\pm$ D.E. de marbofloxacin tras su administración endovenosa a las diferentes edades en estudio. (Letras distintas $P < 0.05$).

En cambio, si observamos la figura 3, podemos percibir que el área bajo la curva se va reduciendo conforme el animal crece, siendo significativas las diferencias entre los 2-3 días con los de 20-21 y 50 días.

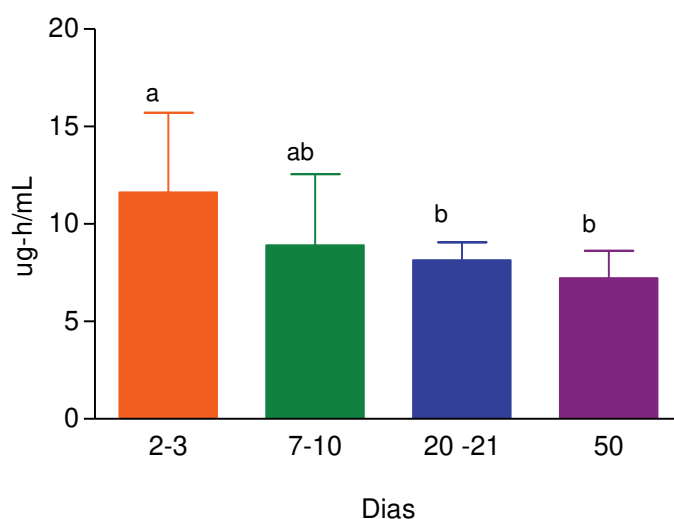


Figura 3: Valores promedio del área bajo la curva (AUC) $\pm$ D.E. de marbofloxacin tras su administración endovenosa a las diferentes edades en estudio. (Letras distintas $P < 0.05$).

El volumen de distribución, conforme avanza la edad se va incrementado, diferenciándose ya a los 50 días de forma significativa de la primera semana de vida (figura 4).

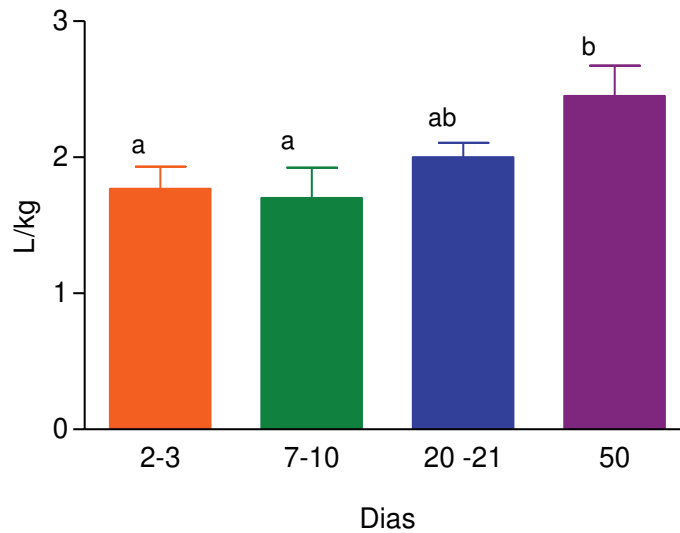


Figura 4: Valores promedio del volumen de distribución en estado de equilibrio (V_{ss}) $\pm$ D.E. de marbofloxacin tras su administración endovenosa a las diferentes edades en estudio. (Letras distintas $P < 0.05$).

El aclaramiento en la figura 5 se puede apreciar que se va incrementado la tasa de depuración del fármaco conforme avanza la edad, siendo significativa la diferencia entre los 2-3 días y los 50 días de edad.

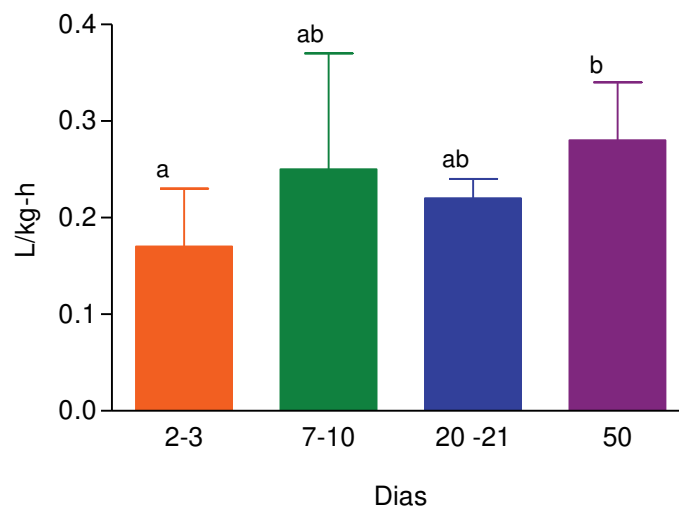


Figura 5: Valores promedio del volumen del aclaramiento total (Cl_t) $\pm$ D.E. de marbofloxacin tras su administración endovenosa a las diferentes edades en estudio. (Letras distintas $P < 0.05$).

5.3 Farmacocinética de marbofloxacin tras la administración intramuscular y subcutánea 7-10 días

En la figura 6 se puede apreciar el perfil de concentración de marbofloxacin en función del tiempo tras su administración endovenosa, intramuscular y subcutánea. Se puede apreciar que marbofloxacin se absorbe rápidamente desde el lugar de administración, alcanzando tempranamente concentraciones sanguíneas similares a las obtenidas por la vía endovenosa e incluso superándolas levemente.

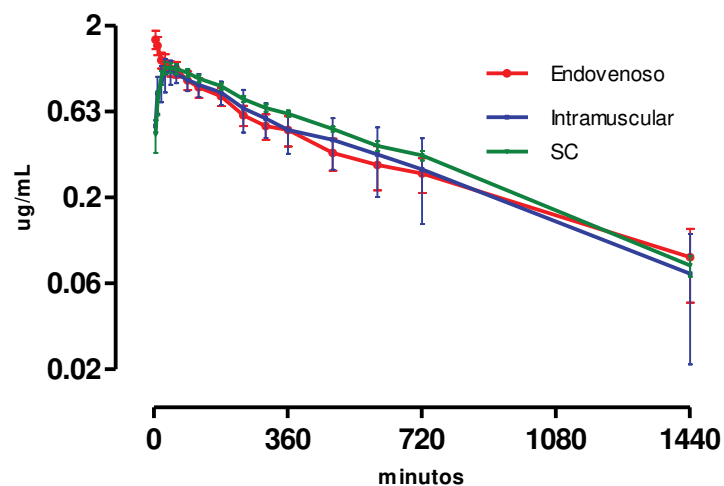


Figura 6: Curva semilogarítmica de concentración en función del tiempo de marbofloxacina ($X \pm D.E.$) administrado por vía endovenosa, intramuscular y subcutánea (2 mg/kg) a búfalos de 7 – 10 días de vida.

En la tabla 2 podemos se exponen los distintos parámetros cinéticos que describen la disposición del fármaco tras su administración intramuscular y subcutánea, no apreciándose diferencias significativas entre los parámetros cinéticos robustos. Se aprecia que el fármaco rápidamente es absorbido del lugar de aplicación indicado por su bajo valor de $t_{1/2ab}$ y T_{max} , alcanzando un C_{max} de 1.11 ± 0.19 a 1.17 ± 0.17 µg/mL para la vía intramuscular y subcutánea respectivamente. La absorción del fármaco es completa al revisar el valor de biodisponibilidad y un MAT cercano al valor 1.

Tabla 2: Parámetros farmacocinéticos de marbofloxacin administrada por vía intramuscular (IM) y subcutánea (SC) a búfalos de 7 a 10 días de edad.

Parámetros Farmacocinéticos		7 - 10 días			
		IM		SC	
		X	D.E.	X	D.E.
Peso	kg	47,9	4,38	48,1	5,2
t_{1/2λ}	h	5,75	1,59	6,2	0,89
t_{1/2ab}	h	0,17	0,03	0,13	0,03
C_{max}	μg/ml	1,11	0,19	1,17	0,17
T_{max}	h	0,78	0,21	0,62	0,14
AUC_(0-t)	μg·h/mL	9,12	2,98	10,43	0,48
AUC_∞	μg·h/mL	9,2	3,51	11,22	0,57
MRT	h	8,88	2,44	8,83	1,2
MAT	h	0,91	0,37	0,86	0,23
F	%	103,29	33,45	128,11	8,33

5.4 Farmacocinética marbofloxacin tras la administración oral a distintas edades

En la figura 7, se aprecia la disposición temporal de las concentraciones de marbofloxacin tras su administración oral. Se observan claras diferencias en las concentraciones alcanzadas según la edad, llamando además la atención la fuerte dispersión de los datos de concentración en los diferentes tiempos en la cinética realizada a los 2-3 días de nacido y las bajas concentraciones plasmáticas alcanzadas, observándose a primera vista que el perfil más bajo de absorción se da a los 50 días de nacido siendo el mayor a los 2-3 días de edad, mantenidos el orden de las edades en los C_{max} alcanzados.

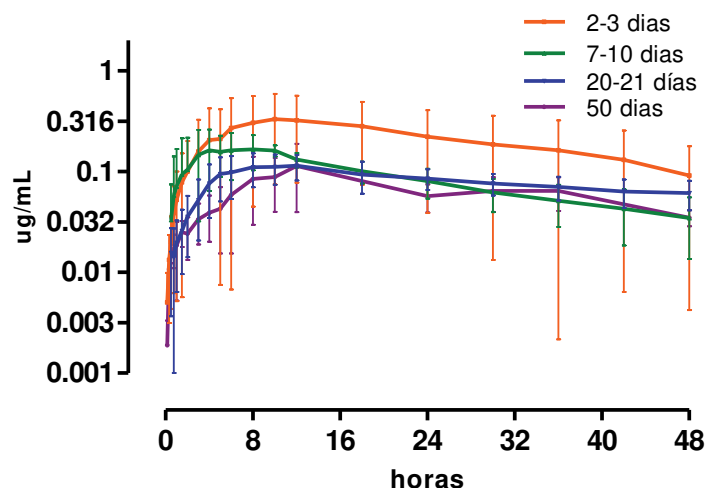


Figura 7: Curva semilogarítmica de concentración en función del tiempo de marbofloxacina ($X \pm D.E.$) administrado por vía oral (2 mg/kg) a búfalos de diferentes edades dentro de su primeros 50 días de vida.

En la tabla 3, se pueden observar los valores calculados para los parámetros farmacocinéticos descriptivos de la disposición de marbofloxacina tras una dosis única vía oral en bolo a búfalos a diferentes edades. Las diferencias estadísticamente significativas entre las edades se aprecian en los parámetros de $t_{1/2\lambda}$, $t_{1/2ab}$, C_{max} , T_{max} , $AUC_{(0-24)}$, MAT y F.

Tabla 3: Parámetros farmacocinéticos de marbofloxacina administrada por vía oral (2 mg/kg) en búfalos a diferentes edades dentro de su primeros 50 días de vida.

Parámetros Farmacocinéticos		Orales							
		2 - 3 días		7-10 días		20 - 21 días		50 días	
		X	D.E.	X	D.E.	X	D.E.	X	D.E.
Peso	kg	38,50	5,41	48,40	5,26	51,88	11,83	95,63	4,75
$t_{1/2\lambda}$	h	21,57 ^{ac}	8,54	18,76 ^a	8,95	40,65 ^b	14,72	34,94 ^{bc}	15,66
$t_{1/2ab}$	h	3,29 ^{ab}	1,04	1,85 ^a	0,89	2,20 ^a	0,90	4,73 ^b	2,04
C_{max}	μg/ml	0,36 ^a	0,27	0,20 ^{ab}	0,08	0,13 ^b	0,03	0,11 ^b	0,07
T_{max}	h	12,00 ^a	4,47	7,20 ^b	3,11	9,25 ^{ab}	3,40	11,50 ^a	1,00
Lag time	h	0,69	0,43	0,57	0,27	0,55	0,24	0,80	0,87
$AUC_{(0-24)}$	ug·h/mL	9,86 ^a	8,01	4,19 ^b	0,89	3,97 ^b	1,15	3,08 ^b	1,39
AUC_{∞}	ug·h/mL	13,06	11,01	5,34	1,47	7,64	3,14	4,75	1,06
MRT	h	35,45 ^{ab}	11,71	30,16 ^a	14,58	62,98 ^c	21,69	53,55 ^{bc}	22,82

MAT_{po}	h	23,91 ^a	7,65	22,19 ^a	11,31	53,94 ^b	13,48	44,54 ^b	12,47
F	%	84,79 ^a	40,52	47,04 ^b	9,98	48,72 ^b	14,10	42,67 ^b	19,32

Letras distintas P < 0.05

Si observamos el comportamiento de la semivida de absorción de marbofloxacin por la vía oral en la figura 8, podemos apreciar que la tasa de absorción alcanza su valor más bajo las tres primeras semanas de vida para luego incrementarse a los 50 días de vida, siendo este de todos modos superior pero no significativo con lo obtenido para el grupo de los 2-3 días. En cambio el MAT_{po} a partir de los 20 días de edad se duplica y mantiene similar a los 50 días (tabla 3).

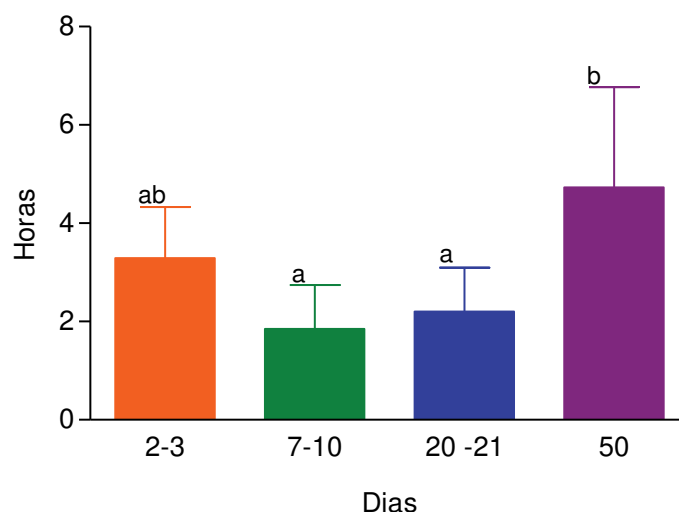


Figura 8: Valores promedio de la semivida de absorción ($t_{1/2ab}$) $\pm$ D.E. de marbofloxacin tras su administración oral a las diferentes edades en estudio. (Letras distintas P < 0.05).

El tiempo (T_{max}) al cual se alcanza la C_{max} presenta diferencias según la edad, siendo el periodo más corto el descrito para el grupo de 7-10 días, fluctuando entre los grupos entre las 7,2 y 12 horas (figura 9 y tabla 3).

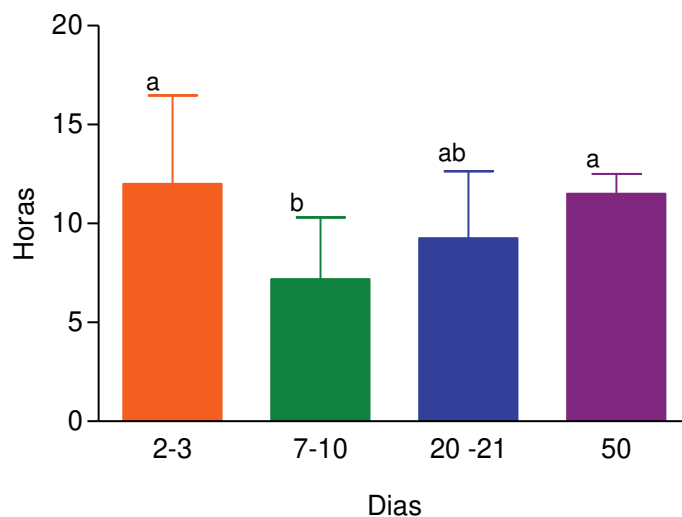


Figura 9: Valores promedio del tiempo máximo ($T_{\max}$) $\pm$ D.E. de marbofloxacin tras su administración oral a las diferentes edades en estudio. (Letras distintas $P < 0.05$).

La $C_{\max}$, alcanzo su mayor valor en el grupo de 2-3 días, decayendo a medida que avanza en la edad, haciéndose significativa la diferencia a partir de los 20-21 días (figura 10 y tabla 3).

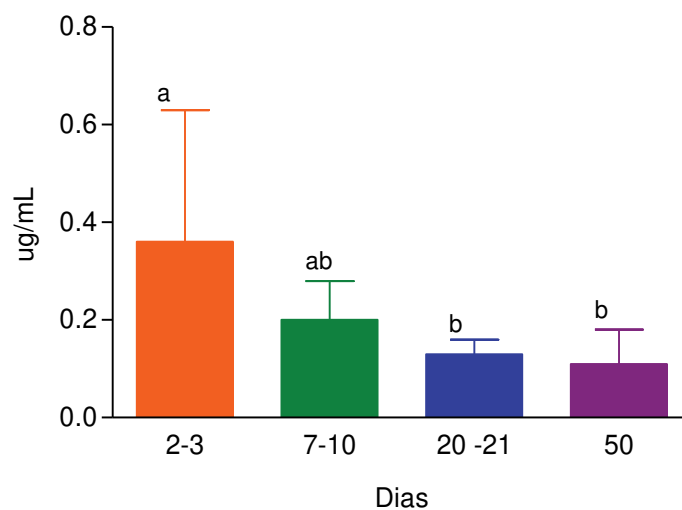


Figura 10: Valores promedio de la concentración máxima ($C_{\max}$) $\pm$ D.E. de marbofloxacin tras su administración oral a las diferentes edades en estudio. (Letras distintas $P < 0.05$).

Al analizar la vida media de eliminación (figura 11), se aprecia que ésta se mantiene estable en los primeros dos grupos y luego se observa un incremento significativo el día 20-21 manteniéndose sin diferencia el día 50.

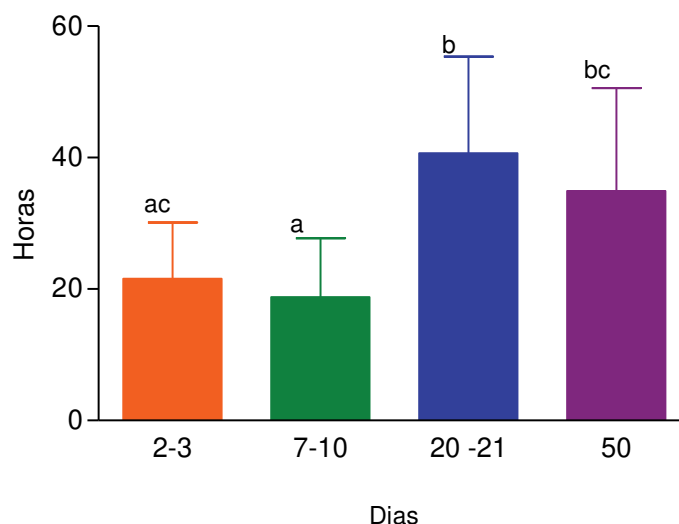


Figura 11: Valores promedio de la semivida ($t_{1/2}$) $\pm$ D.E. de marbofloxacin tras su administración oral a las diferentes edades en estudio. (Letras distintas $P < 0.05$).

Si observamos las figuras 12 y 13 donde se aprecia el comportamiento del área bajo la curva y los valores de biodisponibilidad alcanzados, vemos que los valores son bajos, salvo el valor promedio del grupo 2-3 días que presenta un valor significativamente mayor, pero con un gran dispersión en la primera semana para luego mantenerse estable y de valores similares en las próximas semanas de vida.

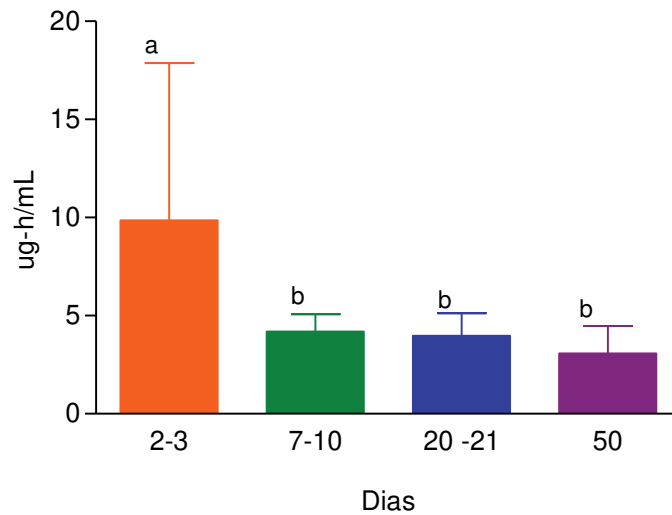


Figura 12: Valores promedio del área bajo la curva (AUC) $\pm$ D.E. de marbofloxacin tras su administración oral a las diferentes edades en estudio. (Letras distintas $P < 0.05$).

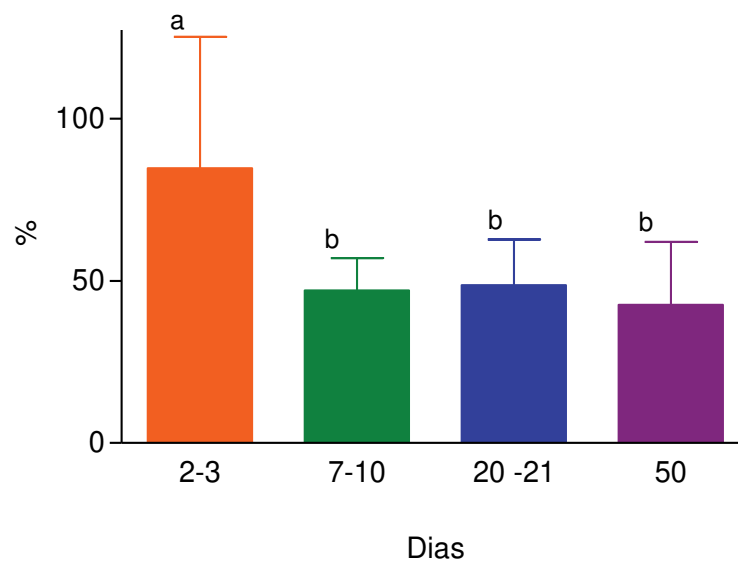


Figura 13: Porcentaje promedio de la biodisponibilidad (F) $\pm$ D.E. de marbofloxacin tras su administración oral a las diferentes edades en estudio. ($P > 0.05$ entre las distintas edades).

5.5 Valores de eficacia terapéutica según índices PK/PD

En la tabla 4 se muestran los rangos de CIM obtenidos en diferentes cepas de bacterias aisladas de bovinos lecheros. Se observa que los valores de CIM₉₀ varían de 0.02 a 0.5 ug/ml, siendo el más sensible las cepas de *S. Aureus* y la que obtuvo el mayor valor *Salmonella spp.*

Tabla 4: Valores de concentración inhibitoria mínima de marbofloxacin (ug/mL) ante cepas bacterianas aisladas de casos clínicos bovinos de un establecimiento lechero.

	CIM ₅₀	Rango	CIM ₉₀
<i>E. coli</i>	0,05	0,02 - 0,25	0,25
<i>Schigella spp.</i>	0,02	0,01 - 0,06	0,06
<i>S. aureus</i>	0,01	0,001 - 0,02	0,02
<i>K. pneumoniae</i>	0,09	0,03 - 0,25	0,25
<i>Salmonella spp.</i>	0,19	0,06 - 0,50	0,50
<i>P. aeruginosa</i>	0,09	0,03 - 0,25	0,25

Basándose en los valores cinéticos de C_{max} y AUC obtenidos y los valores de CIM₉₀ descritos en la tabla 4, se obtuvieron los valores de eficacia PK/PD, entendiéndose como eficaz cuando el valor C_{max}/CIM supera el valores de 12 y cuando el valor AUC/CIM supera las 125 h. Se aprecia que a las dosis utilizadas estos valores de eficacia no son superados en todos los casos, solo para *S. aureus*, el cual en caso de la vía oral no se cumple en las edades de 20-21 y 50 días para el índice C_{max}/CIM.

Tabla 5: Predictores de eficacia terapéutica ($C_{\max}/\text{CIM}$ y $\text{AUC}_{0-24}/\text{CIM}$) estimados para marbofloxacin tomando valores de CIM_{90} de cepas aisladas de casos clínicos bovinos.

Vía	Edad /días	<i>E. coli</i>		<i>Schigella spp</i>		<i>S. aureus</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>Salmonella spp</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
		$C_{\max}/\text{CIM}$	AUC/CIM	$C_{\max}/\text{CIM}$	AUC/CIM	$C_{\max}/\text{CIM}$	AUC/CIM	$C_{\max}/\text{CIM}$	AUC/CIM	$C_{\max}/\text{CIM}$	AUC/CIM	$C_{\max}/\text{CIM}$	AUC/CIM
EV	2-3	12,2	46,5	48,8	48,8	195,4	745,7	12,2	46,5	6,1	23,3	12,2	46,5
	7-10	8,0	35,6	31,8	31,8	127,5	571,0	8,0	35,6	4,0	17,8	8,0	35,6
	20-21	7,5	32,6	29,9	29,9	119,9	521,9	7,5	32,6	3,7	16,3	7,5	32,6
	50	6,3	28,9	25,3	25,3	101,4	462,6	6,3	28,9	3,2	14,4	6,3	28,9
IM	7-10	4,4	36,8	17,8	17,8	71,2	589,7	4,4	36,8	2,2	18,4	4,4	36,8
SC	7-10	4,7	41,7	18,7	18,7	75,0	668,6	4,7	41,7	2,3	20,9	4,7	41,7
PO	2-3	1,5	39,5	5,8	5,8	23,4	632,3	1,5	39,5	0,7	19,7	1,5	39,5
	7-10	0,8	16,8	3,2	3,2	12,7	268,6	0,8	16,8	0,4	8,4	0,8	16,8
	20-21	0,5	15,9	2,1	2,1	8,3	254,2	0,5	15,9	0,3	7,9	0,5	15,9
	50	0,5	12,3	1,8	1,8	7,4	197,4	0,5	12,3	0,2	6,2	0,5	12,3

A partir de los valores cinéticos obtenidos se puede establecer un punto de corte de CIM₉₀ para la eficacia terapéutica según vía y edad (tabla 6), si el valor CIM₉₀ del patógeno aislado es superior al punto de corte se deberá considerar modificar el régimen de dosificación, incrementar la dosis o en su defecto cambiar de antibiótico.

Tabla 6: Valores teóricos de CIM₉₀ necesarios para cumplir con los índices de eficacia a la dosis de 2 – 2.5 mg/kg según la vía de administración y edad del búfalo.

Vía	Edad/ días	CIM ₉₀	CIM ₉₀
		$C_{\max}/\text{CIM}_{90} > 12$	$\text{AUC}/\text{CIM}_{90} > 125 \text{ h}$
EV	2-3	0,25	0,09
	7-10	0,17	0,07
	20-21	0,16	0,07
	50	0,13	0,06
IM	7-10	0,09	0,07
SC	7-10	0,10	0,08
PO	2-3	0,03	0,08
	7-10	0,02	0,03
	20-21	0,01	0,03
	50	0,01	0,02

Tomando el valor mayor de CIM₉₀ obtenido en el ensayo, que corresponde a *Salmonella spp* con 0,5 µg/ml, se calculó la dosis recomendada de marbofloxacin según edad y vía, estas se muestran en la tabla 7. Se aprecia que la dosis utilizada de 2 mg/kg/día sería adecuada para la vía endovenosa, intramuscular y subcutánea, no así si se administra por la vía oral donde habría que administrar una dosis de 4,7 mg/kg/día.

Tabla 7: Dosis de marbofloxacin recomendada según edad y vía para lograr la eficacia terapéutica ante *Salmonella spp.*

Vías	edades	Dosis mg/kg/día
EV	2-3 días	2
	7-10 días	2,2
	20-21 días	1,8
	50 días	2
IM	7-10 días	1,9
SC	7-10 días	1,9
PO	2-3 días	3,5
	7-10 días	4,6
	20-21 días	4
	50 días	4,7

6. DISCUSIÓN

Para la detección y cuantificación de marbofloxacin, se utilizó la cromatografía líquida de alta eficacia con detector ultravioleta-visible (HPLC/uv), siguiendo el método propuesto por Schneider y col., (1996) que entre otros factores varía la longitud de onda a 295 nm.

Diversos autores de estudios cinéticos emplearon también el método microbiológico para la detección y cuantificación de fluoroquinolonas en diferentes especies de interés veterinario (Shem-Tov y col., 1998; Adams y col., 2005; Albarellos y col., 2005) y con elevados porcentajes de recuperación, como describen Haritova y col., (2006) en ovejas con valores de 94,38 % para la enrofloxacin o Goudah y col., (2007) en búfalos con valores del 90 % para la marbofloxacin, como así también valores superiores al 93% para moxifloxacin en sangre de búfalos según Pathania y Sharma (2010).

En nuestro método cromatográfico y con el objetivo de controlar las posibles variaciones que pudieran producirse durante los procesos de extracción, desecación y detección, se utilizó como patrón interno ofloxacin, ya que sus características físico-químicas son muy similares a las de marbofloxacin.

Kietzman y Loscher (1990), describen que los fármacos administrados a rumiantes de producción neonatos, exhiben diferencias significativas en sus características cinéticas cuando se los compara con los adultos de la misma especie.

Las diferencias en la intensidad y duración de los efectos de un fármaco entre los animales recién nacidos y adultos, se pueden atribuir a una mayor biodisponibilidad y a una mayor distribución y una eliminación más lenta durante el período neonatal. Lo anterior lleva a que el perfil de concentración plasmática en función del tiempo sea distinto y por ende las concentraciones del fármaco en el sitio de acción esperado (Baggot, 2001).

Los resultados muestran que marbofloxacin presenta una rápida y amplia distribución tisular tras su administración endovenosa sugiriendo una buena

penetración tisular, el valor de Vss (1,77 L/kg) obtenido es coincidente con el descrito para búfalos adultos (1,65 L/kg) por Goudah y col. (2007), similar valor (1,58 L/kg) muestra moxifloxacin en búfalos de seis a doce meses en estudio realizado por Pathania y Sharma (2010) y es levemente superior a otras especies como perros, cerdos, terneros, bovinos y cabras (Schneider y col., 1996; Petracca y col., 1993; Thomas y col., 1994; Waxman y col., 2004).

Las quinolonas distribuyen ampliamente en tejidos al describir valores que superan 1 L/kg según Ritschel (1994) y Riviere (1997). En ellas se han observado valores de Vss cercanos a 1,09 l/kg en el caso de ovejas (Sidhu y col., 2010), 1,01 l/kg para gatos (Albarellos y col., 2005), 1,3 l/kg en perros (Lefebvre y col., 1998), 1,17 l/kg y 1,48 l/kg en caballos (Carretero y col., 2002; Bousquet-Mélou y col., 2002), 1,15 l/kg en burros (González y col., 2007), 1,65 l/kg y 1,99 l/kg en conejos (Abo-El Seoud y Goudah, 2009; Álamo, 2012) y 1,3 l/kg en cerdos (Ding y col., 2010).

La proporción de agua corporal es mayor en neonatos (70-75%) que en adultos (60%), ya que la proporción de grasa corporal se incrementa con la edad; por lo tanto es de esperar que fármacos liposolubles y baja unión a proteínas plasmáticas (Bregante y col., 2000), como marbofloxacin, presenten un mayor volumen de distribución en jóvenes que en adultos, como fue descrito en cabras por Waxman y col (2004). Siendo lo anterior posiblemente lo explica en gran parte la variación del Vss en nuestro estudio que varió de 1,77 a 2,45 de los 2-3 días a los 50 días de vida respectivamente, similar a lo observado por Kaartinen y col. (1997) en rumiantes, donde el volumen de distribución para enrofloxacin se incrementó entre los terneros de un día de vida y de una semana de edad. Del mismo modo, un aumento de este parámetro con la edad ha sido encontrado después de la administración de la flumequina en terneros entre la primera y quinta semana después del nacimiento, pero no se encontraron diferencias entre las 5 y 18 semanas de edad (Mevius y col., 1990).

La unión a proteínas ha sido considerada como una de las características físico-químicas más importantes en la cinética de los fármacos, jugando un papel potencial en la distribución, excreción y la eficacia terapéutica (Turnidge, 1999). Además se describen diferencias entre razas como la mayor unión de fármacos a proteínas

plasmáticas en corderos que en cabritos, que se atribuye al aumento de la concentración total de proteínas en el suero de corderos a esa edad (San Sampelayo y col., 1998). Por otro lado, se describe una baja unión a proteínas plasmáticas en cabritos si lo comparamos con los adultos (Atef y col., 2002) al igual es el caso de los terneros (Ismail, 2007), la diferencia se describe en el orden del 13,79 % y 31,7 % respectivamente, en búfalos de seis meses Pathania y Sharma (2010) describen un 28% de unión a proteínas plasmáticas. Esta diferencia se podría explicar debido a la hipoalbuminemia relativa que es una característica de los animales jóvenes, esta menor concentración de albúmina plasmática provoca una menor unión de fármacos de pk ácidos (Baggot, 2001; Sappal y col, 2009; Tohamy, 2011). Esta baja unión a proteínas plasmáticas y otros factores de la molécula del fármaco permite que tenga una amplia distribución tisular e intracelularmente (Pathania y Sharma 2010). Esta baja unión a proteínas sustenta también la eficacia terapéutica de las fluoroquinolonas sobre una gran variedad de infecciones bacterianas, ya que la fracción no unida está disponible para actuar sobre la población bacteriana (Zeitlinger y col., 2004).

El tiempo medio de residencia o MRT es un parámetro farmacocinético que tiene una significación similar al tiempo de semivida ya que equivale a la inversa de una constante de eliminación y se obtiene dividiendo el área bajo la curva tiempo-concentración plasmática (AUMC) entre el área bajo la curva (AUC). Ambas áreas pueden obtenerse por integración entre cero e infinito de las curvas compartimentales o bien como hemos señalado para el AUC mediante análisis no compartimental por medio del cálculo de las áreas trapezoidales como es nuestro caso. Se corresponde con el momento estadístico uno (Yamaoka y col., 1978).

Los parámetros MRT y semivida biológica son relativamente prolongadas y éstas son similares a las descritas para cerdos (Petracca y col., 1993) y otras especies de rumiantes como cabras ($t_{1/2\lambda}=7.18$ h; Waxman y col., 2001), vacas ($t_{1/2\lambda}=5.72$ h; Thomas y col., 1994), búfalos machos adultos ($t_{1/2\lambda}=7.52$ h; Goudah y col., 2007) y son superiores a los descritos para ovejas ($t_{1/2\lambda}=2.18$ h, Shem-Tov y col., 1997) y menores a los descritos para perros ($t_{1/2\beta}=12.4$ h; Schneider y col., 1996). Por otra parte, varios informes indican que $t_{1/2\beta}$ de algunas quinolonas pueden ser más cortos en periodo de lactancia que periodo seco o de gestación de la misma especie

(Petracca y col., 1993; Soback y col., 1994). Pathania y Sharma (2010), describen un $t_{1/2\beta}$ de 2.69 h en búfalos de seis meses de edad, valor muy por debajo al obtenido en el presente estudio para marbofloxacin. Esto podría ser debido a la mayor depuración plasmática encontrada en nuestro estudio (0,17 hasta 0,28 l/kg·h) o en búfalo machos adultos (0,18 l/kg·h; Goudah y col., 2007), en comparación con los valores menores registrados en los perros (0,1 l/kg·h. Schneider y col, 1996), esta tasa de eliminación menor en perros se puede atribuir a un efecto del pH de la orina (Fitton, 1992). En cambio para moxifloxacin en búfalos de seis meses su tasa de depuración es superior (0.37 l/kg·h). Las quinolonas son descritas como de reabsorción tubular pH dependiente (Sörgel y Kinzig, 1993).

El aclaramiento plasmático (Cl_t) puede calcularse a partir de las curvas de niveles plasmáticos, recurriendo a métodos modelo-dependientes, basados en los modelos compartimentales y fisiológicos, o utilizando métodos modelo-independientes basados en la estimación del AUC (Doménech Berrozpe y col., 1997). En nuestro estudio, se ha calculado el Cl en función del área bajo la curva mediante análisis no compartimental. Waxman y col. (2004), describen el aclaramiento total en cabras de 1, 3 y 6 semanas de edad que son significativamente menores a los obtenidos en cabras adultas.

Las diferencias observadas en los valores en las especies de rumiantes puede ser explicado a que nuestro método tiene un límite de cuantificación menor al descrito por Shem-Tov y col. (1997) como así también al método de bioensayo por difusión en agar usado por Goudah y col. (2007) y Pathania y Sharma (2010), o por diferencias en la tasa de filtración renal dependiente de la edad o estado fisiológico (Aperia y col., 1977; De Backer, 1986).

Schwark (1992) hace hincapié en su estudio que las principales diferencias en los perfiles cinéticos de fármacos asientan en la inmadurez de los mecanismos de excreción, principalmente a nivel renal. Paap y Nahata (1990), describen que la menor tasa de depuración renal de neonatos es por una disminución en la tasa de filtración y secreción tubular para la mayoría de los antibióticos.

Cuando se administra por vía subcutánea e intramuscular, marbofloxacin se absorbe rápidamente, como se refleja en T_{max} de 0.62 y 0.78 h (SC e IM, respectivamente), y presenta una biodisponibilidad completa ($F= 114\%$ y $89,8\%$ SC e IM, respectivamente). Curiosamente, la administración intramuscular tiene una mayor variabilidad en el parámetro cinético que la administración subcutánea, lo que podría ser debido a la absorción más errática debido a un mayor grado de irritación de los tejidos (Tohamy, 2011). La biodisponibilidad descrita para las fluoroquinolonas es elevada, supera el 80 % en búfalos de seis meses que recibieron moxifloxacin. Altos valores de biodisponibilidad se asemejan a la administración endovenosa para el tratamiento de infecciones leves a moderadas (Pathania y Sharma 2010).

La disposición de marbofloxacin por vía oral y en función a los días pos nacimiento se aprecia que la menor velocidad de absorción es a los 7-10 días de vida, al igual que el T_{max} como es de esperar, sin embargo el C_{max} se va reduciendo a medida que el animal crece, esto se puede explicar a que el proceso de absorción se modifica a medida que el animal madura su aparato gastrointestinal, en los primeros días de vida la permeabilidad intestinal es particular ante la necesidad de absorción del calostro materno, como así también, la presencia de iones bivalente en leche haciendo que se pierda fármaco por quelación (Toutain y col., 2010). La semivida de absorción no presenta diferencias significativas de los 2-3 días de vida hasta los 20-21 días de vida para luego incrementarse significativamente a los 50 días, lo anterior se explicaría por la inmadurez de los mecanismos involucrados en los procesos de absorción gastrointestinal también descritos por Kietzman y Loscher (1990) y Schwark (1992), sumado a que para Toutain y col. (2010) la tasa de absorción está muy influenciada en los rumiantes por el transito del contenido retículo - omasal al duodeno, situación que nuestro caso, los animales a los 50 días presenta un mayor desarrollo ruminal y cambiando en ese caso la tasa de transito duodenal, modificando además la biodisponibilidad del fármaco. Por otro lado el efecto del primer paso es para Alarcón y McNamara (2003) una reducción de la biodisponibilidad relativa del fármaco, al encontrar diferencias en los mecanismos de difusión y transporte de fármacos en la barrera de absorción, situación que se refleja en nuestro estudio en que la biodisponibilidad del fármaco se reduce conforme avanza en la edad.

Como se mencionó la absorción oral presenta una fuerte variación, y una biodisponibilidad mayor a los 2-3 días de vida para luego ir decreciendo conforme avanza la edad hasta un valor de 43% a los 50 días, esto se podía deber a que el desarrollo funcional del rumen se realiza en tres fases: la fase no rumiante, hasta la tercera semana de edad, la fase de transición, entre las tres y las ocho semanas y la fase adulta, desde las ocho semanas (De Backer y Bogaert, 1983), donde el pH abomasal es de 7,5 al nacimiento, pero desciende a 4 en pocas horas con la ingestión de calostro o leche. En las siguientes dos semanas de vida, con el aumento de actividad de la pepsina el pH desciende a 2. Al ir cambiando a una dieta sólida, el pH promedio del abomaso pasa a ser de 3,6 mientras que el pH abomasal del adulto es de 2-3 (De Backer, 1986). Además, en terneros, no se producen movimientos de los proventrículos durante las dos primeras semanas de vida. A las tres semanas comienza una leve motilidad del retículo seguido por un lento movimiento del rumen. A partir de la sexta semana, en terneros alimentados con forraje, se aprecia la contracción bifásica del retículo y un fuerte movimiento ruminal. Esta falta de actividad propulsiva en el neonato afecta el tránsito de los fármacos administrados por vía oral y produce un retraso en la absorción de los mismos (De Backer y Bogaert, 1983). En terneros, se observó una disminución de la biodisponibilidad de tetraciclinas, penicilinas, cloranfenicol y trimetoprim, tras una alimentación láctea. Para el caso de las quinolonas, la quelación con cationes di o trivalentes, puede interferir con su absorción (Martínez y col., 2006). Por tanto la menor biodisponibilidad determinada en animales neonatos y de 10 días podría deberse a un fenómeno de quelación con cationes bivalentes como el calcio, presentes en la leche materna.

Las diferencias en la disposición de los fármacos dentro de misma especie (edades) e inter especies priman las diferencias anatómicas, fisiológicas y metabólicas principalmente (Toutain y col., 2010). Pero para que un fármaco esté disponible para la absorción primero éste debe liberarse de su formulación, en este caso en particular cuando se administró una forma sólida de marbofloxacin vía oral se debe considerar la cinética de disolución de la forma farmacéutica del medicamento y considerar la solubilidad del fármaco libre en el sitio de absorción. Las fluoroquinolonas describen importantes variaciones en su absorción en las diferentes especies exhibiendo amplios rangos de biodisponibilidad (Vancustem y col., 1990). Se describe una

reducción de la biodisponibilidad para las fluoroquinolonas cuando son administradas oralmente después de la ingesta de alimentos al formar quelatos con cationes bivalentes como el Ca^{++} , Fe^{++} , Al^{++} principalmente. La liposolubilidad de estas moléculas lleva a que su absorción sea pasiva, sin embargo otros mecanismos pueden influir en la absorción intestinal (Dautrey y col., 1999; Rabbaa y col, 1997). Se ha descrito transportadores a nivel de la membrana apical para varias fluoroquinolonas como esparfloxacina, levofloxacina y norfloxacina, pudiendo estos transportadores saturarse y competir con otras moléculas (Griffiths y col., 1994). Este sistema de transportadores se los involucra también en la eliminación de estos fármacos, ya que permiten la secreción activa de estos de sangre a la luz intestinal, descrito para ciprofloxacina, norfloxacina y pefloxacina, describiéndose diferentes transportadores para diferentes fluoroquinolonas, a modo de ejemplo esparfloxacina es un sustrato de la P-glicoproteína y la ciprofloxacina es mediado por transportadores catiónicos y/o aniónicos orgánicos (Dautrey y col., 1999).

Marbofloxacina pertenece al grupo de antibacterianos cuya actividad es concentración dependiente, es decir, producen la muerte bacteriana en función de la concentración alcanzada (Papich 2014). En consecuencia, los dos parámetros farmacocinético-farmacodinámicos (PK-PD), que mejor correlacionan el éxito clínico, tanto en el tratamiento de una infección como en la prevención de la aparición de mutantes resistentes, son la relación entre la concentración plasmática máxima y la concentración inhibitoria mínima ($C_{\text{máx}}/\text{CIM}$) y el área bajo la curva con la concentración inhibitoria mínima (AUC/CIM) (Xuan y col, 2001).

In vitro y en estudios *in vivo*, se ha establecido que para que los agentes antimicrobianos dependientes de la concentración, la relación $\text{AUC}_{0-t}/\text{CIM}$ es el factor más importante en la predicción de la eficacia, donde la tasa de curación clínica es mayor al 80% cuando esta relación es superior a 100-125 h, si los pacientes son inmunocompetentes (Papich y Riviere, 2001; Papich, 2014), considerándose en el caso concreto de las fluoroquinolonas como antimicrobianos AUC-dependientes.

Un segundo factor de predicción de la eficacia de los antibióticos dependientes de concentración es la relación $C_{\text{máx}}/\text{CIM}$, teniendo en cuenta que los valores superiores a 8-10 daría lugar a mejores resultados clínicos (Dudley, 1991; Toutain y Lees,

2004). Altas relaciones de $C_{\max}/\text{CIM}$ también se han asociado con una menor incidencia de desarrollo de resistencia (Walker y Dowling, 2006). Hay pocos datos sobre la actividad antibacteriana de marbofloxacin frente a patógenos aislados del búfalo (Russi y col., 2009). Sin embargo, estudios anteriores mostraron la susceptibilidad a marbofloxacin de las cepas patógenas de la especie bovina de los países europeos (Meunier y col., 2004; Kroemer y col., 2012).

Con modelos animales y empleando diferentes quinolonas se ha observado que la razón $\text{AUC}/\text{CIM} \geq 100\text{-}125$ ó de $C_{\max}/\text{CIM} \geq 8\text{-}10$ son buenos predictores de eficacia clínica (Craig y Dalhoff, 1998; Turnidge, 1999).

Los valores de CIM_{90} declarados por diversos autores y que corresponden a aislamientos de bovinos son *Haemophilus somnus* (0,03 mg / ml), *Pasteurella multocida* (0,015 mg / ml), *Escherichia coli* (0,015 mg / ml) y *Salmonella spp* (0,06 mg / ml). A partir de ellos se pueden establecer puntos de corte para un valor de CIM de 0,06 mg/ml, dando valores de índices de eficacia de 18,5 a 33,3 y 152,8 a 695,3 para $C_{\max}/\text{CIM}_{90}$ y $\text{AUC}/\text{CIM}_{90}$, respectivamente. Estos valores están por sobre a los fijados como eficaces en una terapia antimicrobiana (Dudley, 1991; Toutain y Lees, 2004; Walker y Dowling, 2006). Siendo estos valores de CIM muy inferiores a los obtenidos de aislamientos en bovinos lecheros, lo que pone en evidencia la variabilidad de la sensibilidad de las bacterias en distintos sistemas de explotación. Teniendo en cuenta los valores obtenidos para los índices de eficacia, se puede afirmar que, en los bubalinos, tras una administración IV, SC o IM de 2 mg/kg/día de marbofloxacin serían adecuados para el tratamiento de las diarreas y las infecciones respiratorias causadas por bacterias con susceptibilidad altas como *E. coli*, *Salmonella spp.*, *H. somnus* o *P. multocida*, siendo colibacilosis y salmonelosis el más frecuente responsable del síndrome diarreico en los búfalos recién nacidos (Borriello y col., 2010; Muzaffer y Bukhari, 2003).

En cambio según los resultados obtenidos en el presente estudio se aprecia que los valores de CIM son mayores a los descritos en la literatura, por lo que las dosis utilizada requiere ser ajustada en relación a la edad y la sensibilidad bacteriana, en especial para la vía oral para la cual la dosis se debe incrementar a 4,7 mg/kg/día. La dosis óptima de marbofloxacin, calculada usando la ecuación propuesta por

McKellar y col. (2004) para el tratamiento de las infecciones con $CIM_{90} \leq 0,5 \mu/ml$ (y apuntar $AUC/CIM \geq 125 h$) en los terneros de búfalo es de 1,9 mg /kg para la vía intramuscular y subcutánea cada 24 horas.

7. CONCLUSIONES

- 1.- Se describen diferencias cinéticas entre las edades, se acepta la hipótesis de trabajo.
- 2.- La absorción oral (biodisponibilidad) de marbofloxacin presenta fuerte variación individual y su biodisponibilidad se reduce a medida que se incrementa la edad.
- 3.- La absorción por la vía intramuscular y subcutánea (biodisponibilidad) de marbofloxacin es total, exhibiendo rápidamente concentraciones plasmáticas similares a las alcanzadas por la vía endovenosa.
- 4.- Futuros estudios son necesarios para obtener los valores de CIM de las bacterias aisladas de bucerros enfermos.
- 5.- Teniendo en cuenta el perfil farmacocinético de la droga y factores predictivos de eficacia, marbofloxacin es una herramienta terapéutica en los bucerros después de la administración de 2 mg/Kg por vía SC o IM para tratar diarreas e infecciones respiratorias causadas por las bacterias susceptibles. En caso de la vía oral requiere incrementarse la dosis en un 235 %.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Abo El-Seoud KA, Goudah A. 2009. Influence of *Pasteurella multocida* infection on the pharmacokinetic behavior of marbofloxacin after intravenous and intramuscular administrations in rabbits. *Journal of Veterinary Pharmacological Therapy*. 33: 63-68.
2. Acar JF, Goldstein FW. 1996. Disk susceptibility. En: *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 4th edn. Ed. Lorian, V. pp. 1-51. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
3. Adams AR, Haines GR, Brown MP, Gronwall R, Merritt K. 2005. Pharmacokinetics of difloxacin and its concentration in body fluids and endometrial tissues of mares after repeated intragastric administration. *Canadian Journal of Veterinary Research. Revue Canadienne de Recherche Veterinaire*. 69 (3): 229-235.
4. Álamo L. 2012. Estudio farmacocinético de marbofloxacino en conejos. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
5. Alarcón J, McNamara P. 2003. Pharmacokinetics in the newborn. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 55: 667-686.
6. Albarellos GA, Montoya L, Landoni MF. 2005. Pharmacokinetics of marbofloxacin after single intravenous and repeat oral administration to cats. *Veterinary Journal*. 170(2): 222-229.
7. Aliabadi FS, Lees P. 2002. Pharmacokinetics and pharmacokinetic/pharmacodynamic integration of marbofloxacin in calf serum, exudate and transudate. *Journal of Veterinary Pharmacological Therapy*. 25: 161-174.
8. Aminimanizani A, Beringer P, Jelliffe R. 2001. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of the newer fluoroquinolone antibacterials. *Clinical Pharmacokinetics*. 40: 169-187.
9. Aperia A, Broberger O, Herin P, Joelsson I. 1977. Renal hemodynamics in the perinatal period: a study in lambs. *Acta Physiologica Scandinavica*. 99: 261.
10. Appelbaum PC, Hunter PA. 2000. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 16: 5-15.
11. Arancibia A. 1994. Empleo de modelos y cinética de los procesos. En: *Curso Internacional Farmacocinética Clínica*. Departamento de Ciencias y Tecnología

Farmacéuticas, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile, Santiago.

12. Atef M, El-Banna HA, El-Aty A, Goudah A. 2002. Pharmacokinetics of difloxacin in goats. DTW. Deutsche. Tierärztliche Wochenschrift. 109: 320-323.
13. Baggot JD, Short CR. 1984. Drug disposition in the neonatal animal, with particular reference to the foal. Equine Veterinary Journal. 16: 364.
14. Baggot JD. 2001. The Physiological Basis of Veterinary Clinical Pharmacology, first ed. Iowa State University, Ames, IA, USA.
15. Ball P, Tilloston G. 1995. Tolerability of fluoroquinolone antibiotics. Past, present and future. Drug safety. 13(6): 344-356.
16. Ball P. 2000. Quinolone generations: natural history or natural selection. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 46(Suppl T1): 17-24.
17. Baroni EE, Díaz DC, Picco E, Rubio M, Rodríguez C, Boggio JC, San Andrés MI. 2007. Comparative pharmacokinetics of sulphamethazine after intravenous administration in bovine (*Bos taurus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) calves. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 30: 271-274.
18. Bartocci S. Amici A, Verna M, Terramoccia F, Martillotti F. 1997. Solid and fluid passage rate in buffalo, cattle and sheep fed diets with different forage to concentrate ratios. Livestock Production Science. 52: 201-208.
19. Bebear CM, Renaudin H, Charron A, Clerc M, Pereyre S, Bebear C. 2003. DNA gyrase and topoisomerase IV mutations in clinical isolates of *Ureaplasma spp.* and *Mycoplasma hominis* resistant to fluoroquinolones. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 47: 3323-3325.
20. Beltrán C. 2004. Farmacocinética y farmacodinamia de antimicrobianos: Utilidad práctica. Revista chilena de Infectología. 21(1): 39-44.
21. Benet LZ, Deanna L, Sheiner LB. 1996. The Dynamics of Drug Absorption, Distribution and Elimination. En: Goodman & Gilman. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9ª ed., Mc Graw Hill. New York.
22. Bertino J, Fish D. 2000. The safety profile of the fluoroquinolones. Clinical Therapeutics. 22: 798-817.
23. Borriello G, De Carlo E, Iovane G, Capuano F. 2010. Genetic characterization of *Salmonella* strains isolated from water buffalo calves with diarrhea. Revista Veterinaria. 21 (Supl. 1): 190-194.

24. Bousquet-Melou A, Bernand S, Schneider M, Toutain PL. 2002. Pharmacokinetics of marbofloxacin in horses. *Equine Veterinary Journal*. 34 (4): 366-372
25. Bregante MA, De Jong A, Aramayona JJ, García MA, Solans C, Rueda S. 2000. Protein binding of fluoroquinolones applied to livestock and companion animals. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 23 (Suppl. 1) (CD-ROM).
26. Carretero M, Rodríguez C., San Andrés MI, Fores P, De Lucas JJ, Nieto J, San Andrés MD, González F. 2002. Pharmacokinetics of marbofloxacin in mature horses after single intravenous and intramuscular administration. *Equine Veterinary Journal*. 34: 360-365.
27. Cid Carcamo E. 1982. Introducción a la farmacocinética. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Washington.
28. Craig WA. 1998. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clinical Infectious Diseases*. 26: 1-12.
29. Craig WA, Dalhoff A. 1998. Pharmacodynamics of fluoroquinolones in experimental animals. In: Born GVR, Cuatrecas P, Ganten D, Herken H, Melmon KL, Starke K. (Eds.), *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer, Berlin, pp. 208-232.
30. Cruz V, Andrade IF, Días De Sousa JC, Neto AI, Nascimento V. 2001. Avaliação do consumo e da capacidade digestiva de búfalos e bovinos. *Ciencias Agrotecnicas*. Lavras. 25(6): 1406-1412.
31. Dautrey S, Felice K, Petiet A, Lacour B, Carbon C, Farinotti R. 1999. Active intestinal elimination of ciprofloxacin in rats: modulation by different substrates. *British Journal of Pharmacology*. 127: 1728-1734.
32. De Backer P. 1986. Comparative neonatal pharmacokinetics. In *Comparative Veterinary Pharmacology, Toxicology and Therapeutics*, 1st edn. Eds Van Miert, A.S.J.P.A.M., Bogaert, M.G. and Debackere, pp. 161–171 M. MTP Press Limited, Lancaster.
33. De Backer P, Bogaert MG. 1983. Drug bioavailability in the developing ruminant. In: Ruckebush Y, P. L. Toutain, and G. D. Koritz (Ed.) *Veterinary Pharmacology and Toxicology*. p 133. MTP Press, Lancaster, U.K.
34. Ding H, Li Y, Chen Z, Rizwan-Ul-Haq M, Zeng Z. 2010. Plasma and tissue cage fluid pharmacokinetics of marbofloxacin after intravenous, intramuscular, and

- oral single-dose application in pigs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 33: 507-510.
35. Doménech Berrozpe J, Martínez Lanao J, Plá Delfina JM. 1997. *Biofarmacia y Farmacocinética*. Ed. Síntesis S.A., Madrid. Volumen 1. Páginas: 35, 94-115, 278 392-420.
 36. Dudley MN. 1991. Pharmacodynamic and Pharmacokinetics of antibiotics with special reference to the fluoroquinolones. *The American Journal of Medicine*. 91 (Suppl. 6A): 45-50.
 37. EMEA. 1996. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines and Information Technology Unit. Marbofloxacin summary report, 3/96. Available from: <http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/007996en.pdf>>
 38. Fitton A. 1992. The quinolones. An overview of their pharmacology. *Clinical Pharmacokinetics*. 22 (Suppl. 1): 1-11.
 39. Franzolin R. 1994. Feed efficiency: a comparison between cattle and buffalo. *Buffalo Journal*. 2: 39-50.
 40. Gibaldi M, Perrier D. 1982. *Pharmacokinetics*. 2^a ed., Marcel Dekker, INC. New York.
 41. González F, Rodríguez C, De Lucas JJ, Waxman S, San Andrés MD, Serres C, Nieto J, San Andrés MI. 2007. Pharmacokinetics of a single intravenous dose of marbofloxacin in adult donkeys. *Veterinary Record*. 161: 133-136
 42. Goudah A, Abd El-Aty AM, Regmi NL, Shin HC, Shimoda M, Shim JH. 2007. Single -dose pharmacokinetics of marbofloxacin in Egyptian Buffalo (*Bubalus bubalis*) steers. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*. 120: 215-220.
 43. Griffiths N, Hirst B, Simmons N. 1994. Active intestinal secretion of fluoroquinolone antibacterials ciprofloxacin, norfloxacin and pefloxacin; a common secretory pathway?. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 269: 496-502.
 44. Groves CP. 1989. Bovidae. In: *Fauna of Australia Volume 1B Mammalia*. Eds Walton, D.W. & Richardson B.J. pp 1-14. Australian Government Publishing Service. Canberra.

45. Haritova AM, Rusenova NV, Parvanov PR, Lashev LD, Fink-Gremmels J. 2006. Integration of pharmacokinetic and pharmacodynamics indices of marbofloxacin in turkeys. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50(11): 3779-3785.
46. Hawkey PM. 2003. Mechanisms of quinolone action and microbial response. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 51(Suppl 1): 29-35.
47. Ihrke PJ, Papich MG, Demanuelle TC. 1999. The use of fluoroquinolones in veterinary dermatology. *Veterinary Dermatology*. 10: 193-204.
48. Ismail M. 2007. Disposition kinetics of difloxacin after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration in calves. *Veterinary Research Communication*. 31: 467-476.
49. Kaartinen L, Panu S, Pyorala S. 1997. Pharmacokinetics of enrofloxacin in newborn and one-week-old calves. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 20: 479-482.
50. Kamerling SG, Owens JG. 1994. Models for assessing the relationship between drug concentration and drug effect in performance horses. *British Veterinary Journal*. 150(6): 507-525.
51. Kietzmann M, Loscher W. 1990. Peculiarities of pharmacokinetics in young animals. *Berliner Munchner Tierarztliche Wochenschrift*. 103: 277-282.
52. Kinabo LD, McKellar QA. 1989. Current models in pharmacokinetics: applications in veterinary pharmacology. *Veterinary Research Communication*. 13(2): 141-157.
53. Kroemer S, Galland D, Guérin-Faubleé V. 2012. Survey of marbofloxacin susceptibility of bacteria isolated from cattle with respiratory disease and mastitis in Europe. *Veterinary Record*. 170 (2): 53.
54. Lefebvre HP, Schneider M, Dupouy V, Laroute V, Costes G, Delesalle L, Toutain PL. 1998. Effect of experimental renal impairment on disposition of marbofloxacin and its metabolites in the dog. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 21(6): 453-461.
55. Lode H, Borner K, Koeppe P. 1998. Pharmacodynamics of fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases*. 27: 33-39.
56. Marín P, Fernández-Varón E, Escudero E, Cárceles CM. 2007. Pharmacokinetics after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration of difloxacin in sheep. *Research in Veterinary Science*. 83(2): 234-238.

57. Martínez M, McDermott P, Walker R. 2006. Pharmacology of the fluoroquinolones: A perspective for the use in domestic animals. *The Veterinary Journal*. 172: 10-28.
58. Martin-Jimenez T, Riviere J. 1998. Population pharmacokinetics in veterinary medicine: Potential use for therapeutic drug monitoring and prediction of tissue residues. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 21: 167-189.
59. Mason IL. 1974. Environmental physiology. In: *The husbandry and health of the domestic buffalo*. Ed Ross Cockrill, W. pp 88-104. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy.
60. McKellar QA, Sanchez Bruni SF, Jones DG. 2004. Pharmacokinetic /pharmacodynamic relationships of antimicrobial drugs used in veterinary medicine. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 27: 503-514.
61. Meunier D, Acar JF, Martel JL, Kroemer S, Vallé M. 2004. Seven years survey of susceptibility to marbofloxacin of bovine pathogenic strains from eight European countries. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 24: 70-80.
62. Mevius DJ, Breukink HJ, Guelen PJM, Jansen T, De Greve B. 1990. Pharmacokinetics, metabolism, and renal clearance of flumequine in veal calves. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 13: 159-169.
63. Mouton JW, Dudley MN, Cars O, Derendorf H, Drusano GL. 2002. Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs: an update. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 55: 601-607.
64. Muzaffer S, Bukhari H. 2003. Effect of chemoprophylaxis against neonatal buffalo calf diarrhea over normal physiology of buffalo neonates. *Online Journal of biological Sciences*. 3(3): 282-286.
65. Nicolau D. 2003. Optimizing outcomes with antimicrobial therapy through pharmacodynamics profiling. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 9(4): 292-296
66. Nightingale Ch. 1993. Pharmacokinetic considerations in quinolone therapy. *Pharmacotherapy*. 13(2): 36-38.
67. Nows J. 1992. Pharmacokinetics in immature animals: a review. *Journal of Animal Science*. 70: 3627-3634.
68. Paap C, Nahata M. 1990. Clinical pharmacokinetics of antibacterial drugs in neonates. *Clinical Pharmacokinetics*. 19: 280-318.

69. Papich M. 2014. Pharmacokinetic-pharmacodynamics (PK-PD) modeling and the rational selection of dosage regimes for the prudent use of antimicrobial drugs. *Veterinary Microbiology*. 171: 480-486.
70. Papich MG, Riviere JE. 2001. Fluoroquinolone antimicrobial drugs. In: *Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 8th edn. Ed Adams, H.R., Iowa State University Press, pp. 907. Ames, Iowa.
71. Pathania R, Sharma S. 2010. Pharmacokinetic and bioavailability of moxifloxacin in buffalo calves. *Research in Veterinary Science*. 89: 108-112.
72. Petracca K, Riond JL, Graser T, Wanner M. 1993. Pharmacokinetics of the gyrase inhibitor marbofloxacin influence of pregnancy and lactation in sows. *Journal of Veterinary Medicine A*. 40: 73-79.
73. Prescott JF, Baggot DJ, Walker RD. 2002. *Terapéutica Antimicrobiana en Medicina Veterinaria*. 3ªed. Editorial Intermédica. 668 pp.
74. Rabbaa L, Dautrey S, Colas-Linhart N, Carbon C, Farinotti R. 1997. Absorption of ofloxacin isomers in the rat small intestine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 41: 2274-2277.
75. Ritschel W. 1992. *Handbook of Basic Pharmacokinetics*. Ed. Drug Intelligence Publications INC. U.S.A.
76. Ritschel W. 1994. *Curso Internacional de Farmacocinética Clínica*. Dpto. de Ciencias y Tecnología Farmacéuticas, Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Santiago, Chile.
77. Riviere J. 1997. Basic Principles and techniques of pharmacokinetics modeling. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 28: 3-19.
78. Riviere J. 2009. Pharmacokinetic. In: Riviere, J. and Papich, M. *Veterinary pharmacology and therapeutics*. 9th ed. Wiley Blackwell. Ames, Iowa, USA. Pp 1524
79. Riviere J. 2011. Noncompartmental models. In: *Comparative Pharmacokinetics: Principles, Techniques and Applications*. Wiley Blackwell. Ames, Iowa, USA. Pp 456
80. Rodvold KA, Neuhauser M. 2001. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones. *Pharmacotherapy*. 21: 233S-252S.
81. Russi N, Pellerano B, Moroni C, Alegre M, San Andrés MI, Baroni EE. 2009. Susceptibilidad a antibióticos de *staphylococcus spp.* coagulasa positivos aislados de mastitis subclínica de *bubalus bubalis*. XIX Jornadas Nacionales y

XIV Latinoamericanas de Farmacología y Toxicología Veterinarias. Córdoba. Argentina.

82. San Sampelayo MR, Lupiani MJ, Guerrero JE, Boza J. 1998. A comparison of different metabolic types between goat kids and lambs: key blood constituents at different times in the first two months after birth. *Small Ruminant Research*. 31: 29-35.
83. Sappal, R, Chaudhary RK, Sandhu HS, Sidhu PK. 2009. Pharmacokinetics, urinary excretion and plasma protein binding of danofloxacin following intravenous administration in buffalo calves (*Bubalus bubalis*). *Veterinary Research Communication*. 33(7): 659-67.
84. Schentag JJ. 2000. Clinical pharmacology of the fluoroquinolones: studies in human dynamic/kinetic models. *Clinical Infectious Diseases*. 31(2): 40-44.
85. Schneider M, Thomas V, Boisrame B, Deleforge J. 1996. Pharmacokinetics of marbofloxacin in dogs after oral and parenteral administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 19: 56-61.
86. Schwark W. 1992. Factors that affect drug disposition in food-producing animals during maturation. *Journal of Animal Science*. 70: 3635-3645.
87. Shem-Tov M, Rav-Hon O, Ziv G, Lavi E, Glickman A, Saran A. 1998. Pharmacokinetics and penetration of danofloxacin from the blood into the milk of cows. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 21(3): 209-213.
88. Shem-Tov M, Ziv G, Glickman A, Saran A. 1997. Pharmacokinetics and penetration of marbofloxacin from blood into the milk of cows and ewes. *Journal of Veterinary Medicine A*. 44: 511-519.
89. Shojaee FA, Lee P. 2000. Antibiotic treatment for animals: effect on bacterial population and dosage regimen optimization. *International Journal of Antimicrobial Agents* 14(4): 307-313.
90. Sidhu PK, LandoniMF, Aliabadi FS, Lees P. 2010. PK–PD integration and modeling of marbofloxacin in sheep. *Research in Veterinary Science* 88(1): 134-141.
91. Soback S, Gips M, Bialer M, Bor A. 1994. Effect of lactation on single dose pharmacokinetics of norfloxacin in ewes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 38: 2336-2339.

92. Sörgel F, Kinzig M. 1993. Pharmacokinetics of gyrase inhibitors. Part 2: renal and hepatic elimination pathways and drug interactions. *American Journal of Medicine*. 94: 56-69.
93. Thomas E, Boisrame B, Espinasse J. 1996. Field evaluation of efficacy of a new antimicrobial, marbofoxacin, in the treatment of bovine respiratory disease (BRD). *Proceedings of the XIX World Buiatrics 7 Congress*. Edinburgh, 8-12 July, pp. 54-57.
94. Thomas E, Caldow G L, Borell D, Davot J L. 2001. A field comparison of the efficacy and tolerance of marbofoxacin in the treatment of bovine respiratory disease. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 24: 353-358.
95. Thomas V, Deleforge J, Boisrame B. 1994. Pharmacokinetics of marbofloxacin in preruminant and ruminant cattle. *Proceedings of the 6th International Congress of the European Association of Veterinary Pharmacology and Toxicology (EAVPT)*, Edinburgh, UK, pp. 60-61.
96. Thomas V, Gruet P, Davot JL, Boisrame B. 1997. Essai terrain comparatif évaluant l'efficacité de la marbofloxacin en bolus dans le traitement des diarrhées neonatales du veau. *Proceedings of the Congres de la Societe Francaise de Buiatrie*, Paris.
97. Thomas V, Madelenat A, Davot JL, Boisrame B. 1998. Efficacité et innocuité comparées de la marbofloxacin et de l'oxitetracycline dans le traitement des maladies respiratoires des jeunes bovins. *Recueil de Medecine Veterinaire*. 174: 21-27.
98. Tohamy M. 2011. Age-related intramuscular pharmacokinetic of cefquinome in sheep. *Small Ruminant Research*. 99: 72-76.
99. Toutain PL, Ferran A, Bousquet-Melou A. 2010. Species differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. En: *Comparative and Veterinary Pharmacology, handbook of experimental pharmacology* 199. F. Cunningham et al (eds). DOI 10.1007/978-3-642-10324-7_2. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
100. Toutain PL, Del Castillo, JR, Bousquet-Melou A. 2002. The pharmacokinetic–pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics. *Research in Veterinary Science*. 73: 105-114.

101. Toutain PL, Lees P. 2004. Integration and modeling of pharmacokinetic and pharmacodynamic data to optimize dosage regimens in veterinary medicine. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 27: 467-477.
102. Turnidge J. 1999. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones. *Drugs*. 58: 29-36.
103. Vancutsem PM, Babish JG, Schwark WS. 1990. The fluoroquinolone antimicrobials: structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity. *Cornell Veterinarian*. 80: 173-186.
104. Walker RD. 2000. The use of fluoroquinolones for companion animal antimicrobial therapy. *Australian Veterinary Journal*. 78: 84-90.
105. Walker RD, Dowling PM. 2006. Fluoroquinolones. In: Giguere S; Prescott, J.F., Baggot, J.D. Walker, R.D, Dowling P.M. (Eds), *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. Iowa State University Press, Ames, pp. 263-284.
106. Waxman S, Rodriguez C, Gonzalez F, De Vicente M, San Andrés MI, San Andres M.D. (2001). Pharmacokinetic behavior of marbofloxacin after intravenous and intramuscular administrations in adult goats. *Journal of Veterinary Pharmacological Therapy*. 24: 375-378.
107. Waxman S, San Andrés MD, González M, San Andrés MI, De Lucas JJ, Rodríguez C. 2004. Age-related changes in the pharmacokinetics of marbofloxacin after intravenous administration in goats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 27: 31-35.
108. Wright DH, Brown GH, Peterson ML, Rotschafer JC. 2000. Application of fluoroquinolone pharmacodynamics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 46: 669-683.
109. Xuan D, Zhong M, Mattoes H, Bui KQ. McNabb J, Nicolau DP. Quintiliani, R, Nightingale CH. 2001. *Streptococcus pneumoniae* response to repeated moxifloxacin or levofloxacin exposure in a rabbit tissue cage model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45(3): 794-799.
110. Yamaoka K, Nakagawa T, Uno T. 1978. Statistical moments in pharmacokinetics. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*. 6: 547-558.
111. Zapata B. 2006. Búfalos de Agua, una oportunidad productiva. *Gestión Veterinaria*. 5(3): 14-24.

112. Zeitlinger M, Sauermann R, Tarunmuller F, Georgopoulos A, Muller M, Joukhadar C. 2004. Impact of plasma protein binding on antimicrobial activity using time-killing curves. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*. 54: 876-880.