Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Veterinarias
Programa de Doctorado en Ciencias Veterinarias

Efectos de la respuesta inflamatoria aguda inducida por el lipopolisacárido de *Escherichia coli* O128:B12 sobre la disposición plasmática y distribución tisular de florfenicol y florfenicol amina en conejos y ovinos

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias

VICTORIA MATILDE CAZANGA REYES
CHILLÁN-CHILE
2023

Profesor Guía: Dr. Rubén Pérez Fernández
Dpto. de Ciencias Clínicas
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Ciencias Clínicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dr. Rubén Pérez Fernández
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

Dr. Claudio Aguayo Tapia
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Dr. Tomás Casanova Bustos
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

Dr. Carlos Von Plessing Rossel
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Director de Programa

Dr. Fidel Ovidio Castro Reboredo
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

RECONOCIMIENTO

Se agradece el financiamiento de este trabajo de Tesis a:

Proyecto FONDECYT N° 1130473.

Beca CONICYT Folio 21160902 para estudios de Doctorado Nacional (2016-2019), ANID.

Proyecto FONDECYT N° 1201449.

Laboratorio Farmacología Veterinaria, Departamento de Ciencias Clínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción.

A la memoria de mi abuelo

Osvaldo Cazanga Moncada.

AGRADECIMIENTOS

Ha llegado la etapa final de este proceso y quisiera agradecer a todos quienes me apoyaron de una u otra forma, y estuvieron presentes en el desarrollo de mis estudios de Doctorado.

A mi profesor tutor, Dr. Rubén Pérez, quiero agradecerle profundamente todo su apoyo y dedicación en el desarrollo de este proceso de obtención del grado doctoral, el cual fue muy importante y valioso para hacer posible la culminación exitosa de esta etapa. Agradezco su guía, enseñanzas y exigencia en el trabajo científico y académico que han contribuido de manera importante a mi formación en el área de investigación y docencia. Por su confianza en mi trabajo y aptitudes a lo largo de estos años de trabajo juntos, que han forjado y mantenido mi interés por el trabajo académico y de investigación. A su esposa, Sra. Jessie, agradecerle siempre su cariño y la buena experiencia del trabajo desarrollado juntas en el laboratorio para la obtención de resultados que forman parte de esta tesis.

A mi pareja Braulio, te agradezco por recorrer este camino junto a mí en el transcurso de estos años, por tu gran apoyo, comprensión y paciencia, que han sido de enorme valor en el desarrollo de este proceso. Gracias por tu enorme cariño siempre y por ser mi compañero en esta vida.

Quiero agradecer a mi padre y mi madre por las enseñanzas y valores inculcados desde niña que me permitieron seguir el estudio de mi carrera y formación profesional. A mi padre agradecerle todo su apoyo en cada momento en el transcurso del desarrollo de este grado y por despertar el interés en mí por la ciencia y el ámbito de los animales, desde temprana edad. Gracias a mi tía Roxana por todo su apoyo y atención constante,

a mi tía Marcia por su guía y palabras de ánimo, también a mi tía Livia, mi hermana Valeria y a Marisol por sus buenos deseos en este proceso.

A mis profesores guía de Magíster, Dra. Teresa Pelissier y Dr. Luis Constandil agradezco su confianza y el aprendizaje inculcado en mi formación del Magíster de Farmacología. A mis colegas y amigas de Magíster Verónica y Valeria.

Gracias a Cristina por su apoyo a lo largo de este proceso, también a Paula, Alejandra, Makarena, Alejandra Velázquez, Daniela, Tomás por los consejos y conversaciones compartidas.

Agradezco a los profesores Dr. Claudio Aguayo, y Dr. Mutien Garigliany, por haberme recibido en sus laboratorios donde pude aprender conocimientos valiosos para mi formación en el área de investigación. También a Dr. Daniel Sandoval por su colaboración en análisis moleculares anexos a este trabajo de tesis.

También quisiera agradecer a los profesores de esta comisión evaluadora, por la revisión y correcciones que puedan mejorar este trabajo de tesis.

Gracias al Dr. Fidel Castro, director de Programa, y a la Sra Clara Castro por la amabilidad, gentileza y buena disposición entregada en el desarrollo de este proceso.

Agradezco a la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo ANID por el financiamiento de mis estudios doctorales a través de la Beca CONICYT de Doctorado Nacional, junto con los recursos económicos de gastos operacionales entregados que permitieron el desarrollo de este trabajo de tesis.

Quiero agradecer y destacar el apoyo y colaboración de los estudiantes tesistas del laboratorio de Farmacología, Cristhian, Aracelly y Karin. También a las estudiantes de

práctica Josefa, Michelle y Natalia, cuya labor de cuidados de los conejos del bioterio del Laboratorio de Farmacología fue de enorme ayuda para el desarrollo de este trabajo de tesis. Gracias también a don José Garcés por toda su colaboración en el trabajo con los ovinos de este estudio. Finalmente, quisiera hacer mención de los animales de experimentación que fueron parte de este estudio, ovinos y conejos, destacar que su inclusión y uso en los experimento fue de un valioso aporte para la obtención de los resultados de este trabajo de tesis doctoral. Agradecer a todos aquellos estudiantes que colaboraron en el cuidado de los conejos de nuestro bioterio, que bien sabemos es una labor abnegada pero que se recompensa por nuestro cariño a los animales, especialmente en el cuidado y trabajo con los conejos que hemos desarrollado extensamente y nos ha enseñado el sacrificio de dedicarnos con nuestro esfuerzo a su cuidado y necesidades, como parte de nuestra carrera profesional.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xvi
RESUMEN	xxiii
ABSTRACT	xxviii
INTRODUCCIÓN	1
I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
1. ENFERMEDADES INFECCIOSAS	5
1.1 Impacto en la producción, salud pública y salud animal	5
1.2 Situación enfermedades en Chile	8
1.3 Control enfermedades infecciosas	9
1.4 Farmacocinética de Florfenicol en diferentes especies	17
1.5 Farmacocinética de Florfenicol de Ovinos y Conejos	22
1.6 Florfenicol amina	24
1.7 Farmacocinética de Florfenicol amina	25
2. RESPUESTA INFLAMATORIA AGUDA EN ENFERMEDAD	27
2.1 Características y Componentes fisiológicos de la RIA	27
2.2 Rol de las Citoquinas Proinflamatorias en RIA	30
2.3 Función de proteínas de fase aguda en RIA	33
2.4 Cambios fisiológicos en la RIA	36
2.5 Función del lipopolisacárido en Respuesta Inflamatoria Aguda	40
2.6 Mecanismo de acción del LPS	42
2.7 RIA y su efecto en la farmacocinética de fármacos	44
3. ROL CITOCROMO P450 (CYP450) EN METABOLISMO DE FÁRMACOS	49
3.1 Variaciones del Citocromo P450 (CYP450) entre especies	49
4. VARIACIONES FARMACOCINÉTICAS ENTRE ESPECIES	51
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	53
III. HIPÓTESIS	55
IV. OBJETIVOS	55
1. Objetivo General	55

2. Objetivos Específicos 55

V. MATERIALES Y MÉTODO 56

1. Lugar de Trabajo 56
2. Animales de Experimentación 56
3. Fármacos y Reactivos 59
4. Diseño Experimental 60

- Experimento 1: Efecto de la Administración del LPS de *E. coli* sobre los parámetros de hemograma, perfil bioquímico y marcadores inflamatorios IL-6 y PCR en conejos. 61
- Experimento 2: Efecto de la administración de LPS de *E. coli* sobre la disposición plasmática de FFC y FFC-a en conejos, posterior a la administración IV de FFC. 62
- Experimento 3: Efecto de la administración de LPS de *E. coli* sobre la disposición plasmática de FFC y FFC-a en conejos, posterior a la administración IM: de FFC. 63
- Experimento 4: Efecto de la administración de LPS de *E. coli* sobre la distribución tisular de FFC y FFC-a en conejos, posterior a la administración IM de FFC. 65
- Experimento 5: Efecto de la Administración del LPS de *E. coli* sobre los parámetros de hemograma, perfil bioquímico y marcadores inflamatorios IL-6 y PCR en Ovinos. 66
- Experimento 6: Efecto de la administración de LPS de *E. coli* sobre la disposición plasmática de FFC y FFC-a en ovinos, posterior a la administración IV de FFC. 68
- Experimento 7: Efecto de la administración de LPS de *E. coli* sobre la disposición plasmática de FFC y FFC-a en ovinos, posterior a la administración IM: de FFC. 69
- Experimento 8: Efecto de la administración de LPS de *E. coli* sobre la distribución tisular de FFC y FFC-a en ovinos, posterior a la administración IM de FFC. 70

5. Condiciones Experimentales 73
6. Procedimientos Analíticos 77
7. Análisis Farmacocinéticos 87
8. Integración parámetros PK-PD 88
9. Análisis estadístico 89
VI. RESULTADOS 90
1. Resultados en Conejos 91
1.1. Objetivo 1A 91
1.1.1. Evaluación de los efectos del LPS de *E. coli* como inductor de respuesta inflamatoria aguda en conejos. 91
1.1.2. Efectos de la respuesta inflamatoria aguda sobre la disposición plasmática de FFC y FFC-a en conejos. 100
1.1.2.1. Efectos de la respuesta inflamatoria aguda sobre la disposición plasmática de FFC y FFC-a en conejos, posterior a la administración de FFC Vía IV. 100
1.1.2.2. Efectos de la respuesta inflamatoria aguda sobre la disposición plasmática de FFC en conejos, posterior a la administración de FFC Vía IM. 104
1.1.2.3. Efectos de la respuesta inflamatoria aguda sobre la disposición plasmática de FFC-a en conejos, posterior a la administración de FFC Vía IM. 111
1.2 Objetivo 2A 114
1.2.1 Efectos de la respuesta inflamatoria aguda sobre la distribución tisular de FFC y FFC-a en conejos. 114
2. Resultados en ovinos 119
2.1 Objetivo 1B 120
2.1.1 Evaluación de los efectos del LPS de *E. coli* como inductor de respuesta inflamatoria aguda en ovinos. 120
2.1.2 Efectos de la respuesta inflamatoria aguda sobre la disposición plasmática de FFC y FFC-a en ovinos. 128

2.1.2.1 Efectos de la respuesta inflamatoria aguda sobre la disposición plasmática de FFC y FFC-a en ovinos, posterior a la administración de FFC Vía IV. 128

2.1.2.2 Efectos de la respuesta inflamatoria aguda sobre la disposición plasmática de FFC y FFC-a en ovinos, posterior a la administración de FFC Vía IM. 132

2.2 Objetivo 2B 136

2.2.1 Efectos de la respuesta inflamatoria aguda sobre la distribución tisular de FFC y FFC-a en ovinos. 136

3 Objetivo 3: Comparación de la disposición plasmática y distribución tisular de florfenicol y florfenicol amina, entre conejos y ovinos, posterior a la administración de florfenicol en animales sanos. 141

4 Objetivo 4: Determinación de diferencias de especie en los cambios de disposición plasmática de florfenicol y florfenicol amina inducidos por la administración del lipopolisacárido de *E. coli*, en conejos y ovinos. 149

VII. DISCUSIÓN 156

1. Discusión resultados obtenidos en conejos 157

- Evaluación de los efectos del lipopolisacárido de *E. coli* como inductor de respuesta inflamatoria aguda en conejos. 157
- Efectos de la respuesta inflamatoria aguda sobre la disposición plasmática de florfenicol y florfenicol amina en conejos posterior a la administración de florfenicol vía intravenosa. 170
- Efectos de la respuesta inflamatoria aguda sobre la disposición plasmática de florfenicol en conejos posterior a la administración de florfenicol vía intramuscular. 185
- Integración parámetros PK/PD de FFC en conejos, posterior a la administración intramuscular de FFC. 189
- Efectos de la respuesta inflamatoria aguda sobre la disposición plasmática de florfenicol amina en conejos posterior a la administración de florfenicol vía intramuscular. 198

- Efectos de la respuesta inflamatoria aguda sobre la distribución tisular de florfenicol y florfenicol amina en conejos. 202

2. Discusión resultados obtenidos en ovinos 209

- Efectos de la RIA inducida por el lipopolisacárido de *E. coli* como inductor de respuesta inflamatoria aguda en ovinos. 210
- Efectos de la respuesta inflamatoria aguda sobre la disposición plasmática de florfenicol y florfenicol amina en ovinos posterior a la administración de florfenicol vía intravenosa. 216
- Efectos de la respuesta inflamatoria aguda sobre la disposición plasmática de florfenicol y florfenicol amina en ovinos posterior a la administración de florfenicol vía intramuscular. 224
- Efectos de la respuesta inflamatoria aguda sobre la distribución tisular de florfenicol y florfenicol amina en ovinos. 227

3. Comparación de la disposición plasmática y distribución tisular de florfenicol y florfenicol amina, entre conejos y ovinos, posterior a la administración de florfenicol en animales sanos. 231
4. Determinación de diferencias de especie en los cambios de disposición plasmática de florfenicol y florfenicol amina inducidos por la administración del lipopolisacárido de *E. coli*, en conejos y ovinos. 234

VIII. COMENTARIOS FINALES 237

IX. CONCLUSIONES 242

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 244

XI. ANEXO 277

ÍNDICE DE TABLAS

Figura		Página
Tabla 1	Parámetros farmacocinéticos de florfenicol en diferentes especies animales posterior a su administración intravenosa (IV). Fuente: Extraído y modificado de Lashev y Haritova, 2006.	21
Tabla 2	Modelos de RIA en distintas especies animales para estudio de la farmacocinética de fármacos. Fuente: Elaboración propia.	48
Tabla 3	Parámetros de validación del método analítico utilizado para determinar concentraciones de florfenicol y florfenicol amina en diferentes tejidos de conejos. Fuente: Elaboración propia.	84
Tabla 4	Parámetros de validación del método analítico utilizado para determinar concentraciones de florfenicol en tejidos de ovinos. Fuente: Elaboración propia.	86
Tabla 5	Parámetros de validación del método analítico utilizado para determinar concentraciones de florfenicol amina en tejidos de ovinos. Fuente: Elaboración propia.	86
Tabla 6	Parámetros hematológicos obtenidos en conejos control y conejos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli.* Fuente Elaboración propia.	96
Tabla 7	Parámetros bioquímicos sanguíneos obtenidos en conejos control y conejos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli.* Fuente Elaboración propia.	97
Tabla 8	Promedios de variables del perfil de bioquímica sanguínea obtenidos en conejos control y conejos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (Parte 2). Fuente Elaboración propia.	98

Tabla 9 Parámetros farmacocinéticos de florfenicol posterior a la administración intravenosa de 20 mg/kg en conejos control y conejos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli,* Fuente Elaboración propia. 102

Tabla 10 Parámetros farmacocinéticos de florfenicol amina posterior a la administración intravenosa de 20 mg/kg de florfenicol en conejos tratados con solución salina (control) y tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli.* Fuente Elaboración propia. 104

Tabla 11 Parámetros farmacocinéticos de florfenicol posterior a la administración intramuscular de 20 mg/kg en conejos control y conejos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli.* Fuente: Elaboración propia. 107

Tabla 12 Integración PK/PD para los parámetros $C_{máx}$/MIC y AUC/MIC de florfenicol en plasma de conejos para *Pasteurella multocida y Bordetella bronchiseptica*, posterior a la administración de una dosis de 20 mg/kg vía intramuscular en conejos control y tratados con LPS. Fuente: Elaboración propia. 109

Tabla 13 Integración PK/PD para el parámetro $\%T_{máx}$>MIC de florfenicol en plasma de conejos para *Pasteurella multocida y Bordetella bronchiseptica,* posterior a la administración de una dosis de 20 mg/kg vía intramuscular en conejos control y tratados con LPS. Fuente: Elaboración propia. 110

Tabla 14 Parámetros farmacocinéticos de florfenicol amina posterior a la administración intramuscular de 20 mg/kg de florfenicol en conejos tratados con solución salina (control) y tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli.* Fuente: Elaboración propia. 113

Tabla 15 Promedios de recuento total y diferencial de leucocitos obtenidos en ovinos control y ovinos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli.* Fuente: Elaboración propia. 125

Tabla 16 Promedios de VGA, concentración de hemoglobina, recuento de plaquetas y concentración de proteínas totales obtenidos en ovinos control y ovinos tratados con lipopolisacárido de Esc*herichia coli.* Fuente: Elaboración propia. 126

Tabla 17 Parámetros bioquímicos sanguíneos obtenidos en ovinos control y ovinos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli.* Fuente: Elaboración propia. 127

Tabla 18 Parámetros farmacocinéticos de florfenicol posterior a la administración intravenosa de 20 mg/kg en ovinos control y ovinos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli.* Fuente: Elaboración propia. 130

Tabla 19 Parámetros farmacocinéticos de florfenicol amina posterior a la administración intravenosa de 20 mg/kg de florfenicol en ovinos tratados con solución salina (control) y ovinos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli.* Fuente: Elaboración propia. 132

Tabla 20 Parámetros farmacocinéticos de florfenicol posterior a la administración IM en ovinos tratados con solución salina (control) y tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS). Fuente: Elaboración propia. 134

Tabla 21 Parámetros farmacocinéticos de florfenicol amina posterior a la administración intramuscular de 20 mg/kg de florfenicol en ovinos tratados con solución salina (control) y tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS). Fuente: Elaboración propia. 136

Tabla 22 Parámetros farmacocinéticos de florfenicol administrado vía intravenosa en dosis de 20 mg/kg en ovinos y conejos. Fuente: Elaboración propia. 143

Tabla 23 Parámetros farmacocinéticos de florfenicol amina en ovinos y conejos tratados con 20 mg/kg de FFC via intravenosa. Fuente: Elaboración propia. 145

Tabla 24 Valores de cuociente para la relación de concentraciones tejido/plasma de florfenicol posterior a la administración de 20 mg/kg de florfenicol vía intramuscular en conejos y ovinos sanos. Fuente: Elaboración propia. 148

Tabla 25 Valores de cuociente para la relación de concentraciones tejido/plasma de florfenicol amina posterior a la administración de 20 mg/kg de florfenicol vía intramuscular en conejos y ovinos sanos. Fuente: Elaboración propia. 149

Tabla 26 Promedios de porcentaje de cambio respecto del valor del grupo control (Δ%) de parámetros farmacocinéticos de florfenicol posterior a la administración intravenosa de 20 mg/kg en conejos y ovinos tratados con solución salina (control) y tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli.* Fuente: Elaboración propia. 152

Tabla 27 Promedios de porcentaje de cambio respecto del valor control (Δ%) de parámetros farmacocinéticos de florfenicol amina posterior a la administración intravenosa de florfenicol en dosis de 20 mg/kg en conejos y ovinos tratados con solución salina (control) y tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli.* Fuente: Elaboración propia. 155

Tabla 28 Efectos de la respuesta inflamatoria aguda sobre parámetros farmacocinéticos de diferentes antibióticos administrados vía IV en monogástricos. Fuente: Elaboración propia. 177

Tabla 29 Promedios de índices PK/PD de florfenicol para distintos microorganismos patógenos que afectan al sistema respiratorio en diferentes especies animales. Fuente: Elaboración propia. 194

Tabla 30	Efectos de la respuesta inflamatoria aguda inducida por LPS sobre parámetros farmacocinéticos de diferentes antibióticos administrados vía IV en rumiantes. Fuente: Elaboración propia.	222

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		**Página**
Figura 1	Estructura química de FFC (A) y FFC-a (B). Fuente: Extraído y modificado de Fedeniuk *et al.,* 2015.	12
Figura 2	Vías metabólicas en la biotransformación de FFC. Fuente: Extraído de Imran *et al.,* 2017.	16
Figura 3	Resumen de la fisiología de la respuesta inflamatoria aguda. Fuente: Extraído y modificado de Ebbersole y Cappelli (2000) y Cray et al. (2009).	40
Figura 4	Estructura general del lipopolisacárido. Fuente: Extraído de Hurtado e Iregui, 2010.	42
Figura 5	Esquema general del mecanismo de acción del LPS. Fuente: Extraído y modificado de Lu et al., 2008.	44
Figura 6	Vías en la reducción del metabolismo de fármacos durante infección e inflamación. Fuente: Extraído y modificado de Morgan et al., 2008.	46
Figura 7	Esquema de extracción de muestras sanguíneas en conejos, correspondiente a Experimento 1. Fuente: Elaboración propia.	62
Figura 8	Esquema de extracción de muestras sanguíneas en conejos posterior a la administración de florfenicol vía intravenoso, correspondiente a Experimento 2. Fuente: Elaboración propia.	63

Figura 9	Esquema de extracción de muestras sanguíneas en conejos posterior a la administración de florfenicol vía intramuscular, correspondiente a Experimento 3. Fuente: Elaboración propia.	65
Figura 10	Esquema de extracción de muestras tisulares en conejos posterior a la administración de florfenicol vía IM, correspondiente a Experimento 4. Fuente: Elaboración propia.	66
Figura 11	Esquema de extracción de muestras sanguíneas en ovinos, correspondiente a experimento 5. Fuente: Elaboración propia.	67
Figura 12	Esquema de extracción de muestras sanguíneas en ovinos posterior a la administración de florfenicol vía intravenoso, correspondiente a Experimento 6. Fuente: Elaboración propia.	69
Figura 13	Esquema de extracción de muestras sanguíneas en ovinos posterior a la administración de florfenicol vía intramuscular, correspondiente a Experimento 7. Fuente: Elaboración propia.	70
Figura 14	Figura 14. Esquema de extracción de muestras tisulares en ovinos posterior a la administración de FFC vía IM, correspondiente a Experimento 8. Fuente: Elaboración propia.	71
Figura 15	Variaciones de la temperatura corporal expresada como diferencia porcentual respecto al valor basal, en conejos control y conejos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli.* Fuente: Elaboración propia.	92
Figura 16	Concentraciones de interleuquina-6 en conejos control y conejos tratados con LPS de *E. coli* (n=5). Fuente: Elaboración propia.	93
Figura 17	Concentraciones de proteína C reactiva en conejos control y conejos tratados con LPS de *E. coli* (n=5). Fuente: Elaboración propia.	94
Figura 18	Curvas semilogarítimicas de concentraciones plasmáticas de florfenicol posterior a la administración de una dosis de 20 mg/kg vía intravenosa en conejos sanos y conejos tratados	101

con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (n=6=). Fuente Elaboración propia.

Figura 19 Curvas de concentraciones plasmáticas de florfenicol amina en conejos sanos y tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (n=6). Fuente: Elaboración propia. 103

Figura 20 Curvas semilogarítimicas de concentraciones plasmáticas de florfenicol posterior a la administración de una dosis de 20 mg/kg vía intramuscular en conejos sanos y conejos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (n=5). Fuente: Elaboración propia. 106

Figura 21 Curvas de concentraciones plasmáticas de florfenicol amina en conejos sanos y tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (n=5). Fuente: Elaboración propia. 112

Figura 22 Promedios (± EEM) de concentraciones tisulares de florfenicol administrado vía intramuscular en dosis de 20 mg/kg en conejos control y conejos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (n=6). Fuente: Elaboración propia. 115

Figura 23 Promedios (± EEM) de relaciones tejido/plasma de florfenicol administrado vía intramuscular en dosis de 20 mg/kg en conejos control y conejos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (n=6). Fuente: Elaboración propia. 116

Figura 24 Promedios ± EEM de concentraciones tisulares de florfenicol amina posterior a la administración de florfenicol vía intramuscular en dosis de 20 mg/kg en conejos control y conejos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (n=6). Fuente: Elaboración propia. 117

Figura 25 Promedios (± EEM) de la relación tejido/plasma de florfenicol amina en conejos control y conejos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (n=6) posterior a la administración vía intramuscular de florfenicol en dosis de 20 mg/kg. Fuente: Elaboración propia. 118

Figura 26 Cambios en la temperatura rectal expresados como porcentaje de diferencia del valor basal (T0), en ovinos control y ovinos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli.* Fuente: Elaboración propia. 121

Figura 27 Concentraciones de Interleuquina-6 en ovinos control y ovinos tratados con LPS de *E. coli.* Fuente: Elaboración propia. 122

Figura 28 Concentraciones de proteína C reactiva en ovinos control y ovinos tratados con LPS de *E. coli.* Fuente: Elaboración propia. 123

Figura 29 Curvas semilogarítimicas de concentraciones plasmáticas de florfenicol administrado vía intravenosa en ovinos control y ovinos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS) (n=5). Fuente: Elaboración propia. 129

Figura 30 Curvas de concentraciones plasmáticas de florfenicol amina posterior a la administración de FFC vía IV en ovinos control y ovinos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS) (n=5). Fuente: Elaboración propia. 131

Figura 31 Concentraciones plasmáticas de florfenicol administrado vía intramuscular en ovinos control y ovinos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS). Fuente: Elaboración propia. 133

Figura 32 Concentraciones plasmáticas de florfenicol amina posterior a la administración intramuscular de FFC en ovinos control y ovinos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS). Fuente: Elaboración propia. 135

Figura 33 Promedios (± EEM) de concentraciones tisulares de florfenicol administrado vía intramuscular en dosis de 20 mg/kg en ovinos control y ovinos tratados con lipopolisacárido de *E. coli.* Fuente: Elaboración propia. 137

Figura 34 Promedios (± EEM) de relación tejido/plasma de florfenicol en ovinos control y ovinos tratados con lipopolisacárido de *E. coli.* (n=5). Fuente: Elaboración propia. 138

Figura 35 Promedios (± EEM) de concentraciones tisulares de florfenicol amina posterior a la administración vía intramuscular de una dosis de 20 mg/kg de florfenicol en ovinos control y ovinos tratados con lipopolisacárido de *E. coli.* Fuente: Elaboración propia. 139

Figura 36 Promedios (± EEM) de relación tejido/plasma de florfenicol amina en ovinos control y ovinos tratados con lipopolisacárido de *E. coli,* posterior a la administración de una dosis de 20 mg/kg de florfenicol, (n=5). Fuente: Elaboración propia. 140

Figura 37 Curvas de concentraciones plasmáticas en el tiempo de florfenicol administrado por vía intravenosa en dosis de 20 mg/kg en ovinos (n=6) y conejos (n=6). Fuente: Elaboración propia. 142

Figura 38 Curvas de concentración plasmática en el tiempo de florfenicol amina posterior a la administración de 20 mg/kg de florfenicol vía intravenosa en ovinos y conejos. Fuente: Elaboración propia. 144

Figura 39 Promedios (± EEM) de concentraciones tisulares de florfenicol posterior a la administración de 20 mg/kg vía intramuscular en ovinos (n=5) y conejos (n=6). Fuente: Elaboración propia. 146

Figura 40 Comparación de los promedios (± EEM) de concentraciones tisulares de florfenicol amina posterior a la administración de 20 mg/kg de florfenicol vía intramuscular en ovinos (n=5) y conejos (n=6). Fuente: Elaboración propia. 147

Figura 41 Concentraciones plasmáticas de florfenicol posterior a la administración de una dosis de 20 mg/kg vía IV en ovinos y conejos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS) (n=5). Fuente: Elaboración propia. 150

Figura 42 Concentraciones plasmáticas de florfenicol amina posterior a la administración de FFC vía IV en conejos y ovinos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS) (n=5). Fuente: Elaboración propia. 153

Figura 43 Vías de señalización inducidas por la acción del Lipopolisacárido (LPS), desencadenantes del proceso inflamatorio. Fuente: Extraído de Mc Carthy et al. (2017). 160

Figura 44 Esquema descriptivo del mecanismo clásico de inducción del proceso febril. Fuente: Extraído de Roth y Blatteis, 2014. 162

Figura 45 Figura 45: Sitio de acción de los fenicoles. Fuente: Extraído de Ríos, 2004. 191

Figura 46 Figura 46. Concentraciones plasmáticas de IL-6 en ovejas adultas. Fuente: Extraído de Naylor et al. 2020. 212

Figura 47 Expresión relativa de CYP3A6 en hígado de conejos posterior a la administración de FFC vía IM en conejos control y conejos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS) (n=5). Fuente: Elaboración propia. 277

RESUMEN

Las infecciones bacterianas constituyen una de las principales causas de pérdidas económicas en los sistemas ganaderos, por lo que el uso de antibacterianos representa una de las alternativas más frecuentemente utilizadas para el tratamiento y control de estas enfermedades. Florfenicol (FFC) es un antibacteriano de uso veterinario que se utiliza principalmente en el control de infecciones respiratorias tanto en rumiantes como monogástricos y es posible de ser utilizado en conejos. La farmacocinética de FFC ha sido ampliamente estudiada principalmente en animales sanos, sin embargo, se desconoce el efecto de la respuesta inflamatoria aguda (RIA) inducida por sepsis sobre la disposición plasmática y distribución tisular de este antimicrobiano. Asimismo, se desconoce el efecto de la RIA sobre las concentraciones de su principal metabolito, florfenicol amina (FFC-a). Considerando que comúnmente este antibiótico será aplicado a animales que cursan con alguna patología infecciosa o estado inflamatorio, es de importancia conocer cómo influye esta condición sobre su comportamiento farmacocinético.

Antecedentes experimentales han demostrado que la RIA inducida por agentes infecciosos puede alterar la farmacocinética y modificar la eficacia de los fármacos o potenciar su toxicidad en los animales. Estas alteraciones son causadas por la liberación de citoquinas proinflamatorias que además de generar un estado febril, producen modificaciones en los procesos de absorción, distribución y eliminación de los fármacos. La administración de lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* (*E. coli*) ha sido un modelo ampliamente utilizado para inducir en forma experimental una RIA, con el propósito de estudiar los cambios causados por la infección sobre la farmacocinética de

antimicrobianos y otros fármacos, ya que permite replicar en los animales la respuesta inflamatoria a la infección.

Se realizó el presente estudio con el objetivo de determinar el efecto de la RIA inducida por LPS de *E. coli* sobre la disposición plasmática y distribución tisular de FFC y FFC-a en dos modelos animales de inflamación aguda sistémica: conejos y ovinos, como representativos de especie monogástrica y rumiante, respectivamente. Además, se estudió si existen diferencias de especie en la disposición plasmática y distribución tisular de FFC y FFC-a posterior a la administración de FFC en animales sanos. También, se evaluó, si existen diferencias de especie sobre los cambios en la disposición plasmática de FFC y FFC-a inducidos por la RIA en respuesta a la administración de LPS.

Se utilizaron conejos de raza Neozelandés y ovinos de raza Suffolk Down que fueron distribuidos en grupos de cinco animales cada uno y asignados a grupo control y grupo tratado con LPS de *E. coli*. Se administraron tres dosis de 1 µg/kg LPS a las 0, 8 y 23 h 15 minutos (Grupo LPS) o solución salina (SS) en igual volumen y frecuencia de administración (Grupo control). Se extrajeron muestras sanguíneas para análisis de hemograma, perfil bioquímico y los marcadores de inflamación interleuquina 6 (IL-6) y proteína C reactiva (PCR). En los animales tratados con LPS se observaron incrementos significativos en las concentraciones de IL-6 y PCR, cambios en el hemograma y perfil bioquímico sanguíneo, modificaciones que estuvieron asociadas a un proceso febril. Estos cambios demuestran la eficacia del modelo de administración de LPS para inducir una RIA en los animales del estudio.

Otros grupos de conejos y ovinos fueron tratados con 3 dosis de LPS o solución salina (control) previo a la administración de 20 mg/kg de FFC y se realizaron muestreos

sanguíneos seriados para análisis farmacocinético. Se observaron cambios significativos en la farmacocinética de FFC y FFC-a respecto de los valores observados en animales control, los cuales estuvieron asociados a disminuciones significativas del *clearance* de FFC, acompañados de aumentos en la vida media de eliminación ($t_{1/2el}$), área bajo la curva (AUC) y tiempo medio de residencia (TMR). Además, se observaron disminuciones significativas en las concentraciones de FFC-a asociadas a disminuciones en los promedios de AUC y en la proporción de metabolito/fármaco activo (MR%).

Con el objetivo de estudiar y comparar la distribución tisular de FFC y FFC-a, en otros grupos de animales tratados con SS o LPS se administró FFC en dosis de 20 mg/kg vía intramuscular. En los animales del grupo control las mayores concentraciones tisulares de FFC se observaron en riñones, seguidos en orden decreciente por músculo, bazo, pulmón, hígado y cerebro. Las mayores concentraciones de FFC-a se observaron en riñón e hígado. En el grupo de conejos tratados con LPS se observaron incrementos significativos de las concentraciones de FFC en músculo, mientras que las concentraciones de FFC-a en hígado, músculo y bazo fueron significativamente mayores a las de los conejos control.

En los ovinos tratados con LPS las concentraciones plasmáticas de FFC fueron mayores que las observadas en el grupo control, las que estuvieron asociadas a disminuciones significativas del *clearance* y a incrementos significativo del AUC del antibiótico. También se observaron aumentos significativos en los promedios de $C_{máx.}$ $T_{máx}$ y AUC del metabolito FFC-a. Las concentraciones tisulares de FFC en riñón, bazo y cerebro fueron significativamente mayores que las observadas en los ovinos del grupo control.

En los animales tratados con LPS del presente estudio, la disminución del MR% de FFC-a se explica por alteraciones en la funcionalidad hepática que caracterizan a la RIA.

En la comparación de los parámetros farmacocinéticos entre animales sanos (grupos control) de ambas especies, se observó que los conejos presentaron promedios de *clearance* de FFC significativamente mayores respecto de los ovinos, cambios que se asociaron a incrementos en los promedios de AUC y MR% de FFC-a, los que pueden atribuirse a diferencias de especie en el metabolismo, y en la excreción renal de FFC.

La RIA inducida por la administración de LPS de *E. coli* produjo cambios sobre la disposición plasmática y tisular de FFC y su metabolito FFC-a, en las dos especies en estudio, caracterizados principalmente por un incremento de las concentraciones plasmáticas de FFC, alteraciones en los procesos de eliminación del antibiótico e incremento de las concentraciones tisulares de FFC y FFC-a en los animales tratados con LPS.

Los resultados del presente estudio son relevantes ya que entregan antecedentes acerca del comportamiento farmacocinético de FFC en presencia de una respuesta inflamatoria aguda, la cual indujo cambios significativos en la disposición plasmática y distribución tisular del antimicrobiano y su metabolito FFC-a. Por lo tanto, cabría esperar que variaciones similares en la farmacocinética de este antibiótico puedan observarse al ser administrado a animales en condiciones de infección. Los resultados obtenidos también entregan antecedentes que son de utilidad para el cálculo de dosificaciones de FFC y aplicación terapéutica de este antibiótico en conejos y ovinos. Considerando las relaciones observadas entre las concentraciones del antibiótico y los valores de concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) para los principales patógenos que afectan

al sistema respiratorio, y el nivel de incremento de concentraciones plasmáticas y tisulares de FFC observados en los animales tratados con LPS, estos pueden ser beneficiosos al evaluar la eficacia terapéutica del antibiótico.

También es relevante tener en consideración las diferencias de especie observadas en el presente estudio sobre la farmacocinética de FFC, al diseñar regímenes de dosificación de este antibiótico en ovinos y conejos, ya que en conejos se pueden presentar concentraciones del antibiótico menos persistentes debido a su mayor metabolismo y nivel de excreción, frente a lo cual pueden ser necesarias modificaciones en la frecuencia de dosificación entre ambas especies.

Palabras Clave: Lipopolisacárido *E. coli,* respuesta inflamatoria aguda, florfenicol, florfenicol amina, farmacocinética.

ABSTRACT

Bacterial infections are one of the main causes of economic losses in livestock systems, so the use of antibacterial drugs represents one of the most frequently used alternatives for the treatment and control of these diseases. Florfenicol (FFC) is a veterinary antimicrobial drug used mainly in the control of respiratory infections in both ruminants and monogastric and can also be used in rabbits. The pharmacokinetics of FFC has been extensively studied mainly in healthy animals, however, the effect of sepsis-induced acute inflammatory response (AIR) on plasma disposition and tissue distribution of this antimicrobial is unknown. The effect of AIR on the concentrations of its main metabolite, florfenicol amine (FFC-a), is also unknown. Considering that this antibiotic will commonly be applied to animals with an infectious pathology or inflammatory condition, it is important to know how this condition influences its pharmacokinetic behaviour.

Experimental evidence has shown that AIR induced by infectious agents can alter the pharmacokinetics and modify the efficacy of drugs or enhance their toxicity in animals. These alterations are caused by the release of pro-inflammatory cytokines which, in addition to generating a febrile state, produce modifications in the processes of absorption, distribution and elimination of drugs. The administration of lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli (E. coli)* has been a widely used model to experimentally induce an AIR, with the purpose of studying the changes caused by infection on the pharmacokinetics of antimicrobials and other drugs, as it allows the inflammatory response to infection to be replicated in animals.

The present study was conducted to determine the effect of *E. coli* LPS-induced AIR on plasma disposition and tissue distribution of FFC and FFC-a in two animal models of acute systemic inflammation: rabbits and sheep, representative of monogastric and ruminant species, respectively. In addition, we studied whether there are species differences in plasma disposition and tissue distribution of FFC and FFC-a following FFC administration in healthy animals. We also assessed whether there are species differences in AIR-induced changes in the plasma disposition of FFC and FFC-a in response to LPS administration.

New Zealand rabbits and Suffolk Down sheep were divided into groups of five animals each and assigned to control and *E. coli* LPS-treated groups. Three doses of 1 μg/kg LPS were administered at 0, 8 and 23 h with 15 min (LPS group) or saline (SS) in equal volume and frequency of administration (control group). Blood samples were collected for hematological and clinical biochemistry analysis, and the inflammatory markers interleukin-6 (IL-6) and C-reactive protein (CRP) were also determined. Significant increases in IL-6 and CRP concentrations and changes in hematological and blood biochemistry analysis were observed in LPS-treated animals and were associated with a febrile process. These changes demonstrate the efficacy of the LPS administration model in inducing AIR in the animals of the study.

Other groups of rabbits and sheep were treated with 3 doses of LPS or saline (control) prior to administration of 20 mg/kg FFC and serial blood sampling was performed for pharmacokinetic analysis. Significant changes in FFC and FFC-a pharmacokinetics were observed in comparison to values observed in control animals, which were associated with significant decreases in FFC clearance, accompanied by increases in elimination

half-life ($t_{1/2}$), area under the curve (AUC) and mean residence time (MRT). In addition, significant decreases in FFC-a concentrations associated with decreases in average AUC and metabolite/active drug ratio (MR%) were observed.

To study and compare the tissue distribution of FFC and FFC-a, in other groups of animals treated with SS or LPS, FFC was administered at a dose of 20 mg/kg by intramuscular route. In the control group animals, the highest tissue concentrations of FFC were observed in the kidneys, followed in decreasing order by muscle, spleen, lung, liver, and brain. The highest FFC-a concentrations were observed in kidney and liver. In the LPS-treated group of rabbits, significant increases in FFC concentrations were observed in muscle, while FFC-a concentrations in liver, muscle and spleen were significantly higher than in control rabbits.

In LPS-treated sheep, plasma concentrations of FFC were higher than those observed in the control group, which were associated with significant decreases in clearance and significant increases in AUC of the antibiotic. Significant increases in the mean $C_{máx}$, $T_{máx}$ and AUC of the FFC-a metabolite were also observed. Tissue concentrations of FFC in kidney, spleen and brain were significantly higher than those observed in control sheep. In the LPS-treated animals of the present study, the decrease in the MR% of FFC-a is explained by alterations in liver functionality that characterise the AIR.

Comparison of pharmacokinetic parameters between healthy animals (control groups) of both species showed that rabbits had significantly higher average FFC clearance compared to sheep, changes that were associated with increases in average AUC and MR% of FFC-a, which may be attributed to species differences in metabolism and renal excretion of FFC.

AIR induced by *E. coli* LPS administration produced changes in plasma and tissue disposition of FFC and its metabolite FFC-a, in both species under study, mainly characterised by increased plasma FFC concentrations, alterations in antibiotic elimination processes and increased tissue concentrations of FFC and FFC-a in LPS-treated animals.

The results of the present study are relevant as they provide information about the pharmacokinetic behaviour of FFC in the presence of an acute inflammatory response, which induced significant changes in the plasma disposition and tissue distribution of the antimicrobial and its metabolite FFC-a. Therefore, it would be expected that similar variations in the pharmacokinetics of this antibiotic could be observed when administered to animals under conditions of infection. The results obtained also provide useful background information for the calculation of FFC dosages and therapeutic application of this antibiotic in rabbits and sheep. Considering the associations observed between antibiotic concentrations and minimum inhibitory concentration (MIC) values for the main pathogens affecting the respiratory system, and the level of increase in plasma and tissue concentrations of FFC observed in animals treated with LPS, these may be beneficial for evaluating the therapeutic efficacy of the antibiotic.

It is also relevant to take into consideration the species differences observed in this study on the pharmacokinetics of FFC when designing dosing regimens of this antibiotic in sheep and rabbits, as rabbits may have less persistent concentrations of the antibiotic due to their higher metabolism and level of excretion, which may require modifications in dosing frequency between both species.

Keywords: *E. coli* lipopolysaccharide, acute inflammatory response, florfenicol, florfenicol amine, pharmacokinetics.

INTRODUCCIÓN

Las diferentes especies animales se encuentran expuestas a múltiples agentes infecciosos, que pueden resultar nocivos y causar la aparición de enfermedades, trayendo consigo el deterioro de la salud animal y reducción de los niveles productivos, así como también conllevar un potencial riesgo a la salud humana.

Frente a la invasión de microorganismos patógenos, el organismo está capacitado para desarrollar una respuesta sistémica para su defensa mediante el establecimiento de complejos mecanismos de tipo inmunológicos y fisiopatológicos. Esta primera respuesta es de tipo inflamatoria, lo cual se traduce en una serie de cambios y alteraciones fisiológicas sistémicas, conocida en conjunto como respuesta inflamatoria aguda (RIA). Esta respuesta incluye reacciones tales como fiebre, inapetencia, variaciones en la irrigación sanguínea a los tejidos y la liberación de múltiples moléculas indicadoras de inflamación (Van Miert, 1990; Roth, 2006).

Dentro de los cambios fisiológicos causados por el estado inflamatorio, se encuentran también modificaciones en la capacidad de procesamiento por parte del organismo, de los fármacos, específicamente en los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción (Riddick *et al*., 2004; Renton, 2005; Morgan *et al*., 2008). Se sabe que esta disminución en la capacidad para regular procesos farmacocinéticos, como el metabolismo y eliminación de ciertos fármacos bajo la condición de un estado inflamatorio, ocurre debido a una alteración en la expresión de las enzimas que participan del metabolismo de fármacos, principalmente el sistema citocromo P450 (CYP450) (Renton, 2001; Morgan, 2009).

En modelos animales donde se ha simulado una RIA mediante la administración de endotoxinas como el lipopolisacárido bacteriano (LPS), se ha observado una regulación a la baja de la expresión hepática de los RNA mensajeros (mRNAs) y de las enzimas del CYP450 (Richardson y Morgan, 2005), como consecuencia de la liberación de moléculas proinflamatorias como citoquinas, específicamente TNF-α, IL-1β e IL-6, entre otras (Renton, 2005; Morgan, 2008).

Para el tratamiento efectivo de las enfermedades infecciosas es fundamental el uso de agentes antimicrobianos; dentro de los cuales se encuentra florfenicol (FFC). Este antibiótico posee un amplio espectro de acción, alta biodisponibilidad y eficacia (Zhang *et al.,* 2008), amplia distribución a los diferentes tejidos inclusive hacia el sistema nervioso central (De Craene *et al.,* 1997). Además, presenta una rápida eliminación del organismo, todas estas características lo hacen ser un antimicrobiano especialmente apto para ser usado en medicina veterinaria (Varma *et al*., 1986; Park *et al.,* 2007). FFC es un fármaco altamente lipofílico (Anadón *et al.,* 2008) y es metabolizado en el hígado mediante el sistema CYP450 (Liu *et al.,* 2011). Luego de su administración, FFC es biotransformado a diversos metabolitos, siendo el principal de ellos la florfenicol amina (FFC-a) (Li *et al.,* 2006).

Diversas investigaciones demuestran que la farmacocinética de distintos fármacos puede verse afectada bajo un estado inflamatorio inducido por una endotoxina como el LPS de *Escherichia coli (E. coli)*. En un estudio en cabras, se demostró que la condición febril inducida por el LPS de *E. coli* puede alterar la farmacocinética de enrofloxacino al comparar con animales sanos (Rao *et al.,* 2000).

La mayoría de los estudios farmacocinéticos en especies animales se han realizado en individuos sanos, y considerando que comúnmente los fármacos como antibióticos serán aplicados a animales que cursan con alguna patología infecciosa o estado inflamatorio, se considera de importancia conocer su comportamiento farmacocinético bajo esta condición (Martínez *et al.,* 2020). Además, es sabido que los procesos farmacocinéticos pueden variar entre distintas especies animales (Toutain *et al.,* 2010) y más aún los efectos de la fiebre sobre la farmacocinética, también pueden experimentar variaciones entre especies (Kumar y Malik, 2003). Considerando estos antecedentes, es de interés utilizar FFC como herramienta farmacológica para dilucidar si el estado inflamatorio inducido por el LPS de *E. coli* serotipo O128:B12, modifica o no la disposición plasmática y tisular de este antibiótico en comparación con animales sanos. Esto permite, además, conocer acerca del nivel de metabolismo que experimenta FFC en esta condición de respuesta inflamatoria aguda, mediante la medición de las concentraciones de su metabolito FFC-a. También permite dilucidar de manera indirecta acerca de la participación del CYP450, en el metabolismo de FFC en dos especies animales de interés y bajo el modelo de respuesta inflamatoria aguda, considerando que FFC es sustrato del CYP450. Para ello, se realizó este estudio en conejos y ovinos, los primeros, representativos de una especie monogástrica, de tamaño pequeño y de fácil manejo. Es una especie que posee interés productivo y clínico, además de experimental. Los ovinos, a su vez, son una especie representativa de rumiantes, de manejo relativamente fácil e interés productivo.

La información generada en este estudio permite entregar antecedentes de utilidad para eventuales requerimientos de ajustes de regímenes de dosificación de FFC, cuando es

administrado en animales que cursan con algún proceso inflamatorio o estado infeccioso en la especie ovina y también entrega antecedentes de su administración en conejos, considerando que FFC potencialmente puede ser utilizado en conejos (Gutiérrez *et al.*, 2022).

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. ENFERMEDADES INFECCIOSAS

1.1 Impacto en la producción, salud pública y salud animal.

Las distintas especies animales están expuestas a diversas enfermedades infecciosas que pueden afectar el estado de salud y ser causa de importantes pérdidas productivas en los planteles ganaderos. Dentro de estas enfermedades las patologías infecciosas de origen bacteriano se encuentran entre las más frecuentes, causando importantes pérdidas económicas (Funk *et al.,* 2013; Cameron y McAllister, 2016; Cunningham *et al.,* 2017). Entre las enfermedades infecciosas, las de tipo respiratorias representan un grave problema en la industria de producción bovina, afectando negativamente la ganancia de peso, la conversión alimenticia y el estado de salud general de los animales (Shin *et al.,* 2005). Por mencionar un ejemplo, dentro de las enfermedades respiratorias, la pasteurellosis neumónica bovina o enfermedad respiratoria bovina causa considerables pérdidas económicas a la industria bovina tanto de leche como de carne en Norteamérica, significando para la industria de ganado estadounidense un costo de $ 3 billones anuales en materia de tratamientos, medidas preventivas, reducción en la eficiencia de conversión alimenticia y pérdidas por muerte de animales (Jeyaseelan *et al.,* 2002). Por lo tanto, representa una de las enfermedades de mayor frecuencia e importancia económica que afectan al ganado bovino (Cameron y McAllister, 2016).

Cabe considerar que después de la industria de producción de carne porcina y aviar, la industria productiva de carne bovina es la tercera mayor industria de carne en el mundo

(Cameron y McAllister, 2016), por lo cual las pérdidas económicas que puedan traer estas enfermedades infecciosas son de gran relevancia.

En cuanto a la producción de pequeños rumiantes, en el año 2013 la población mundial se estimaba en 1073 millones de ovinos y 1006 millones de cabras (Salvesen *et al.,* 2016). La producción intensiva y los grandes rebaños incrementan la ocurrencia de enfermedades de tipo infeccioso o mediadas por endotoxinas (Salvesen *et al.,* 2016). Respecto a las pérdidas económicas en la industria de producción ovina, la neumonía ovina causada por *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica* ha causado considerables pérdidas alrededor del mundo (Confer, 1993; Odugbo *et al.,* 2006; García-Alvarez *et al.,* 2018), estimándose en Nueva Zelanda las pérdidas ovinas por neumonías en 28,1 millones de dólares NZ anuales (Goodwin-Ray *et al.,* 2008). En el Reino Unido el foot rot ovino o pododermatitis infecciosa interdigital ha causado pérdidas por 24 millones de libras esterlinas por año (Bennett y Hickford, 2011) y representa un problema para los productores alrededor del mundo, incluido nuestro país.

Los conejos son susceptibles a infecciones respiratorias causadas comúnmente por *Pasteurella multocida,* lo que deriva en importantes pérdidas económicas, ya que los conejos han incrementado su uso en producción de carne, como mascotas y como especie experimental en la investigación farmacológica (Palócz *et al.,* 2014).

Desde el punto de vista de la salud pública, es importante conocer las consecuencias que puede traer el uso frecuente de antibióticos en medicina veterinaria como es la creciente aparición de resistencia a los antimicrobianos (Silbergeld *et al.,* 2008; Ahmad *et al.,* 2016; Cameron y McAllister, 2016; Prajapati *et al.,* 2017) y la eventual presencia

de residuos de antibióticos en los productos comestibles de origen animal que pueden causar efectos nocivos para la salud humana (Toldrá y Reig, 2006; He *et al.,* 2017).

Dentro de las causas del incremento de la resistencia a antibióticos se encuentran un uso inadecuado de estos fármacos, con selección errónea del antibiótico y aplicaciones subóptimas, o uso abusivo de ellos (Asín-Prieto *et al.,* 2015; Ahmad *et al.,* 2016). Por lo tanto, es de importancia una adecuada y cuidadosa utilización de los antimicrobianos, aplicando dosificaciones óptimas, para disminuir dentro de lo posible el fenómeno de resistencia a los antimicrobianos (Ahmad *et al.,* 2016; Abushaheen *et al.*, 2020). El estudio de los procesos farmacocinéticos entrega una herramienta primordial para establecer una terapia farmacológica efectiva, evitando riesgos de toxicidad, ineficacia o eventual presencia de residuos en tejidos comestibles para el ser humano.

El estudio de la relación existente entre la exposición sistémica al antibiótico (farmacocinética) y sus correspondientes efectos microbiológicos y clínicos (farmacodinamia) se denomina farmacocinética/farmacodinamia; del inglés: *Pharmacokinetics/Pharmacodynamics* (PK/PD) (Martínez *et al.,* 2013; Asín-Prieto *et al.,* 2015).

Este modelamiento PK/PD permite optimizar los regímenes de dosificación de un antibiótico, así como mejorar y evaluar su eficacia (Burgess, 1999; Mc Kellar *et al.,* 2004; Nielsen and Friberg, 2013; Andes y Lepak, 2017). El objetivo es alcanzar las concentraciones terapéuticas necesarias en el sitio de acción, para incrementar las probabilidades de éxito terapéutico para controlar una infección (Andes y Lepak, 2017),

y al mismo tiempo, permite disminuir la probabilidad de contribuir a la resistencia a antibióticos (Mc Kellar *et al.,* 2004; Nielsen and Friberg, 2013; Lees *et al.,* 2015).

Los índices PK/PD que han sido particularmente útiles en optimizar la eficacia antibiótica y minimizar la resistencia a los antimicrobianos son los parámetros de $C_{máx}$/MIC, AUC_{0-t}/MIC, y %T>MIC. Estos relacionan las concentraciones máximas del antibiótico en plasma, sobre las concentraciones inhibitorias mínimas del antibiótico (MIC), el área bajo la curva concentración-tiempo sobre MIC y el tiempo en el cual las concentraciones máximas superan las MIC en % u horas del intervalo de dosificación, respectivamente (Mc Kellar *et al.,* 2004; Asín-Prieto *et al*., 2015; Lees *et al.,* 2015; Andes y Lepak, 2017).

1.2 Situación enfermedades en Chile.

En nuestro país la producción pecuaria se ve afectada por la presencia de distintas enfermedades infecciosas, siendo las principales: brucelosis, carbunco bacteridiano, leptospirosis, paratuberculosis, campilobacteriosis, diarrea viral bovina, neumonía infecciosa de los terneros, tuberculosis bovina, entre otras (SAG, 2014). Respecto a las principales infecciones que afectan a la especie ovina se encuentran el aborto enzoótico ovino, epididimitis ovina, hepatitis necrosante de los ovinos y linfoadenitis caseosa (SAG, 2014). Dentro de las enfermedades infecciosas que afectan a los lagomorfos se encuentra principalmente la mixomatosis (SAG, 2014). En el año 2014 se registraron en bovinos diagnósticos por bronconeumonía fibrinosa, brucelosis bovina, carbunco bacteridiano, clostridiosis, diarrea viral bovina, gastroenteritis infecciosa, leptospirosis, mastitis y neumonía. En el mismo año en ovinos se registraron diagnósticos por brucelosis ovina, carbunco sintomático, clostridiosis, neumonía y pasteurelosis, entre

otros. En lagomorfos se produjeron diagnósticos por la presencia de mixomatosis en conejos (SAG, 2014). En el año 2021, en bovinos se reportaron diagnósticos por rinotraqueitis infecciosa bovina (SAG, 2021). En 2018, en ovinos se registraron diagnósticos por clostridiosis, neumonía y ectima contagiosa (SAG, 2018).

Estas enfermedades causan considerables pérdidas e impacto en la producción animal de nuestro país disminuyendo las ganancias y amenazando además a las exportaciones (Felmer *et al.,* 2009). Si bien existen pocos antecedentes respecto a cifras de pérdida económica (Zurita, 1995; Felmer *et al.,* 2009), Zurita *et al.* (1990) describen promedios de mortalidad de terneros a causa de diarrea infecciosa de alrededor de un 12% en nuestro país, siendo una de las patologías más frecuentes en los planteles bovinos (Zurita, 1995).

1.3 Control enfermedades infecciosas.

Para un efectivo control de las enfermedades infecciosas bacterianas es fundamental la aplicación de las herramientas farmacológicas disponibles en forma de agentes quimioterapéuticos antimicrobianos o antibióticos (Shin *et al.,* 2005; Törneke *et al.,* 2015; Cameron y McAllister, 2016). En particular, el uso de antimicrobianos es determinante para la producción intensiva de distintos rubros de producción animal como el de la carne bovina (Cameron y McAllister, 2016). Dentro de estos antimicrobianos existe una amplia variedad de formulaciones y principios activos disponibles para su uso en medicina veterinaria. Entre ellos, florfenicol (FFC) representa un importante agente antibiótico, de uso exclusivo en medicina veterinaria (Kowalski *et al.*, 2005; Xie *et al.,* 2011), que es

ampliamente utilizado para el control de diversas patologías infecciosas (Li *et al.,* 2006; Zhang *et al.,* 2008).

Florfenicol es un antibiótico sintético miembro de la familia de los anfenicoles, desarrollado en la década de 1970s por Schering- Plough Corp. (United States) (Li *et al.*, 2006). Su nombre químico es ([R-(R*, S*)]-2,2-dicloro-N-[(-(fluorometil) - (-hidroxi-(-[4-(sulfometilo) fenil] etil] – acetamida (Wrzesinski *et al.,* 2006; Schering-Plough, 2007), su fórmula empírica corresponde a $C_{12}H_{14}Cl_2FNO_4S$ y su peso molecular es de 358,21 g/mol (Schering-Plough, 2007).

Respecto a sus características fisicoquímicas, FFC es altamente soluble en solventes orgánicos polares y poco soluble en solución acuosa (Sams, 1994). En su estado sólido, FFC es estable frente al calor, humedad y luz y no es higroscópico (Cook *et al.,* 2004; Schering-Plough, 2007). Debido a su alta lipofilicidad y por ser una molécula neutra, con bajo grado de ionización en un amplio rango de pH, entre 3 y 9, FFC posee una elevada penetración a los tejidos corporales (Schwarz *et al.,* 2004; Anadón *et al.,* 2008).

Se ha descrito amplia distribución de FFC hacia los tejidos en cerdos (Jiang *et al.,* 2006), ovinos (Jianzhong *et al.,* 2004) y bovinos (Adams *et al.,* 1987). En un estudio en terneros realizado por Adams et al. (1987) se observaron altas concentraciones de FFC en riñón, orina, bilis e intestino delgado. Asimismo, las concentraciones de FFC en pulmones, corazón, músculo esquelético, bazo e intestino grueso, fueron similares a las concentraciones plasmáticas, lo cual indica que la penetración de FFC en estos tejidos es alta (Adams *et al.,* 1987).

FFC es un derivado del cloranfenicol, y se diferencia de este último, porque posee un grupo p-metil sulfonilo en vez del grupo p-nitro (EMA, 2002), lo cual se traduce en la mayor seguridad de este antibiótico, al no presentar el riesgo de causar anemia aplásica, la cual está asociada a la presencia del grupo p-nitro en cloranfenicol (Yunis, 1988; Xie *et al.*, 2011; Wang *et al*., 2015). Además, debido a la sustitución del grupo hidroxilo por un átomo de flúor en el carbono 3 (C-3), FFC es menos susceptible a la acción de las enzimas acetilasas bacterianas, por lo cual posee menor probabilidad de generar resistencia bacteriana que cloranfenicol y tianfenicol (Neu y Fu, 1980). Por esto, se considera que FFC tiene varias ventajas frente a otros antibióticos miembros de su mismo grupo, siendo su eficacia antibacteriana comparable a la de cloranfenicol, pero con menor toxicidad y menor desarrollo de resistencia (DeCraene *et al.,* 1997). Adicionalmente, se encuentra prohibido el uso de cloranfenicol en animales de producción (Varma *et al.,* 1986; Adams *et al*., 1987), por lo cual, FFC representa una alternativa terapéutica viable para la industria ganadera y que posee amplio uso en medicina veterinaria, en el tratamiento de diversas enfermedades. En la Figura 1 se presenta la estructura química de FFC y su metabolito FFC-a.

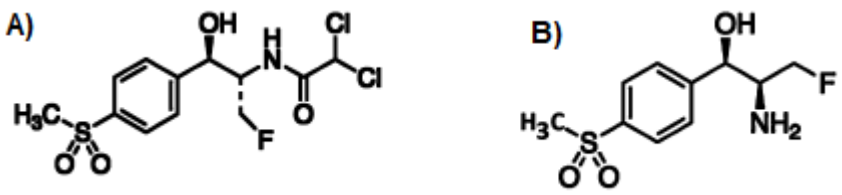

Figura 1. Estructura química de FFC (A) y FFC-a (B). Fuente: Extraído y modificado de Fedeniuk *et al.,* 2015.

FFC posee un amplio espectro de acción, superior a su análogo estructural tianfenicol, siendo activo frente a una gran variedad de microorganismos gram-positivos y gram-negativos, (Kowalski *et al.,* 2005; Li *et al.,* 2006; Marciniec *et al.,* 2009), incluída *Escherichia coli* (Angelos *et al.,* 2000). Su actividad antibacteriana se ejerce sobre patógenos como *Pasteurella multocida, Mannheimia haemolytica* e *Histophilus somni* (Angelos *et al.,* 2000; Lane *et al.,* 2007), y también contra patógenos resistentes a cloranfenicol tales como *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (Neu y Fu, 1980), *Shigella dysenteriae* y enterococos (Varma *et al.,* 1986). Además, FFC posee eficacia contra *Aeromonas salmonicida* (Nordmo *et al.,* 1998).

FFC puede ser utilizado para el tratamiento de diversas patologías animales; en los rumiantes su uso está aprobado para el control de la enfermedad respiratoria bovina (Hoar *et al.,* 1998; Shin *et al.,* 2005), el tratamiento de: la queratoconjuntivitis infecciosa bovina (Angelos *et al.,* 2000), la neumonía de los terneros (Catry *et al.,* 2008) y el foot-rot (Wrzesinki *et al.,* 2003). También está aprobado para tratar infecciones por bacterias susceptibles en cerdos (Ueda y Suenaga, 1995; Shin *et al.,* 2005), tales como la

enfermedad respiratoria porcina (Wrzesinski *et al.,* 2003). En peces, se utiliza en el tratamiento de la vibriosis (Samuelsen y Bergh, 2004) y la furunculosis del salmón (Nordmo *et al.,* 1998). En aves domésticas se ha utilizado para el tratamiento de patos infectados con *Pasteurella* (El-Banna, 1998). Sumado a esto, FFC tiene potencial para ser administrado en otras especies como ovinos (Lane *et al.,* 2004), cabras (Ali *et al.,* 2003) y conejos (Liu *et al.,* 2011), considerando, por ejemplo, que las enfermedades respiratorias en ovinos son causadas a menudo por los mismos patógenos que causan patologías en bovinos (Lane *et al.,* 2007).

FFC es un antibiótico principalmente bacteriostático (Lis *et al.,* 2011; Maaland *et al.,* 2015), y su mecanismo de acción se ejerce mediante la inhibición de la síntesis de proteínas bacterianas (Schwarz *et al.,* 2004; Anadón *et al.,* 2008). Esta se realiza a través de la unión reversible a la subunidad ribosomal 50 s de los ribosomas 70 s procariotas, impidiendo de esta forma la actividad de la enzima bacteriana peptidil transferasa (Cannon *et al.,* 1990; Marciniec *et al.,* 2009). FFC se une específicamente al sitio A del centro peptidil-transferasa, donde interfiere con el desplazamiento del RNA de transferencia (tRNA) y de esta forma evita la formación del enlace peptídico (Khalil *et al.,* 2012). FFC no presenta acción sobre los ribosomas de eucariontes (Schwarz *et al.,* 2004).

Respecto a la eficacia terapéutica de FFC se han descrito valores de MIC_{90} de 1 µg/mL para cultivos de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* aislados de tracto respiratorio de ovinos (Berge *et al.,* 2006). Se ha observado que las concentraciones plasmáticas de FFC se mantienen por sobre este nivel de MIC durante alrededor de 11 horas (h) en ovinos, de acuerdo con los resultados del estudio de Jianzhong *et al.* (2004).

Se han reportado valores del parámetro PK/PD de AUC_{0-t}/MIC de FFC de 183,4 h en bovinos para *Pasteurella multocida* (Sidhu *et al*., 2013), lo cual según los antecedentes descritos por Burgess (1999) es indicativo de una eficacia terapéutica adecuada ya que supera un promedio de AUC_{0-t}/MIC de 125 h, el cual indica éxito terapéutico.

En conejos, se han descrito valores de MIC_{90} de 0,25, 0,5, 1 y 2 µg/mL de FFC para los patógenos más comunes causantes de infecciones respiratorias en conejos: *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica* (Koc *et al.,* 2015). Se han encontrado valores de %T>MIC de FFC, correspondiente al porcentaje del tiempo del intervalo de dosis en el cual las concentraciones plasmáticas superan a las MIC, superiores a un 40% en conejos (Koc *et al.,* 2015), lo cual es indicativo de una eficacia terapéutica óptima con alta tasa de cura bacteriológica (Burgess, 1999).

Sobre su farmacocinética, FFC ha demostrado tener una rápida absorción luego de su administración oral e intramuscular (IM) en cerdos, con valores de tiempo máximo ($T_{máx}$) de 1,35 h y 0,90 h, respectivamente (Liu *et al.,* 2003). FFC reúne las características de poseer una alta biodisponibilidad y una rápida eliminación del organismo, que lo hacen ser muy apto para ser usado en medicina veterinaria, especialmente en las especies destinadas al consumo humano (Varma *et al.,* 1986; Kowalski *et al.,* 2005; Park *et al.,* 2007). FFC alcanza niveles de biodisponibilidad cercanos a un 100% en cerdos posterior a su administración vía oral e IM (Liu *et al.,* 2003; Jiang *et al.,* 2006). En rumiantes se han descrito valores de biodisponibilidad de alrededor de un 88% en terneros posterior a su administración oral (Adams *et al.,* 1987), y de un 78,5% posterior a su administración vía IM en bovinos (Lobell *et al.*, 1994).

Las altas concentraciones alcanzadas por FFC en bilis y la buena absorción que posee después de su administración oral, indican que es probable que FFC experimente un grado de recirculación enterohepática (Adams *et al.,* 1987). También posee una buena llegada al SNC. En terneros, posterior a la administración de una dosis única de FFC de 20 mg/kg vía intravenosa (IV), se obtuvo una disponibilidad en fluido cerebroespinal de 46% relativa al plasma (De Craene *et al.,* 1997).

FFC posee también, un bajo porcentaje de unión a proteínas plasmáticas (Foster *et al.,* 2016), lo cual es consistente con su amplio volumen de distribución y extensa distribución a los tejidos (Lobell *et al.,* 1994). En terneros, FFC alcanza alrededor de un 12% de unión a proteínas del plasma (Lobell *et al.,* 1994), similar al valor descrito en conejos con un 11,65% (El-Aty *et al.,* 2004) mientras que en un bovino adulto se han descrito porcentajes de unión entre 22% y 26% (Adams *et al.,* 1987).

En bovinos FFC es biotransformado a nivel hepático hacia los metabolitos: florfenicol amina (FFC-a), florfenicol ácido oxámico, florfenicol alcohol y monocloroflorfenicol (Sams, 1994). Por otra parte, se ha descrito que FFC es biotransformado por dos vías metabólicas que llevan rápidamente al metabolito común la FFC-a; una vía menor que genera por reacciones de reducción el metabolito monocloroflorfenicol y otra vía mayor, la del florfenicol alcohol con o sin la formación del metabolito intermediario florfenicol ácido oxámico, mediada por reacciones de oxidación (Figura 2) (Anadón *et al.,* 2008; Imran *et al.,* 2017). Aunque la proporción de metabolitos es distinta en las diferentes especies animales de producción, FFC-a es el principal metabolito y el de mayor persistencia (Sams, 1994; Li *et al.,* 2006).

Es así como, FFC-a es el metabolito de mayor permanencia en el hígado, por lo cual se usa como residuo marcador para los cálculos de períodos de resguardo de FFC (EMA, 1999). Por esto, debe considerarse que el proceso de biotransformación de FFC no sólo va a tener incidencia en la eficacia y seguridad de este antibiótico, sino que tiene relación con la acumulación y permanencia de los residuos del fármaco en los productos animales comestibles destinados al consumo humano (Nebbia *et al.,* 2003).

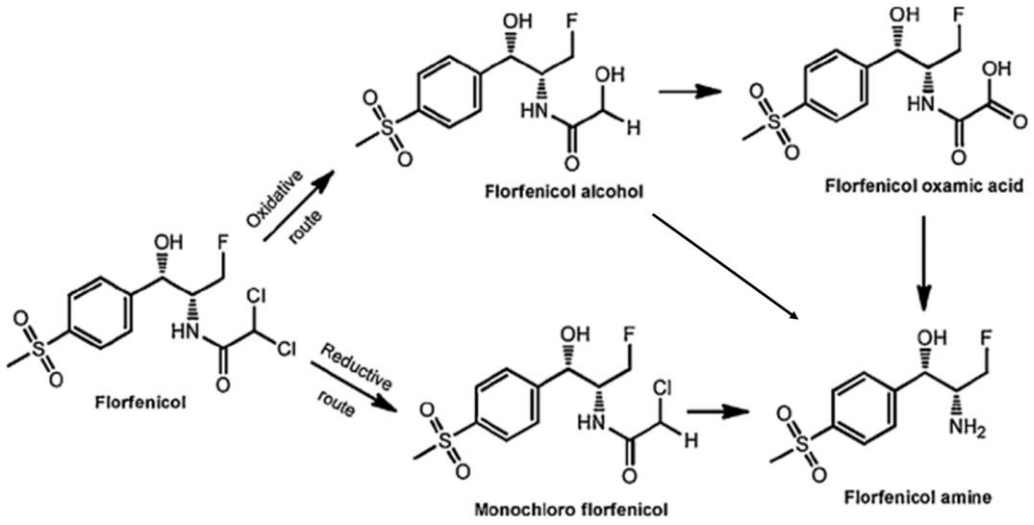

Figura 2. Vías metabólicas en la biotransformación de FFC. Fuente: Extraído de Imran *et al.,* 2017.

Sobre su excreción, en la mayoría de las especies animales FFC y sus metabolitos son excretados por la orina, lo que indica que el riñón es la principal ruta de excreción de este fármaco (Imran *et al.,* 2017). En bovinos, más del 60% de FFC es excretado en la orina como droga primaria sin metabolizar, posterior a la administración oral y endovenosa, indicando una eliminación principalmente renal de FFC (Varma *et al.,* 1986). Por lo tanto, FFC es eliminado del organismo por una combinación de

metabolismo hepático y excreción renal (Varma *et al.,* 1986; Li *et al.,* 2006; Park *et al.,* 2008; Imran *et al.,* 2017).

1.4 Farmacocinética de Florfenicol en diferentes especies.

La farmacocinética de FFC ha sido estudiada en diferentes especies animales; en rumiantes, como ganado bovino, específicamente en terneros (Varma *et al.,* 1986; Adams *et al.,* 1987; Lobell *et al.,* 1994; De Craene *et al.*, 1997), vacas de lechería (Bretzlaff *et al.,* 1987; Soback *et al.,* 1995), ovinos (Ali *et al.,* 2003; Jianzhong *et al.,* 2004; Lane *et al.,* 2004; Palma *et al.,* 2011), y cabras (Atef *et al.,* 2001; Ali *et al.,* 2003). También en cerdos (Voorspoels *et al.,* 1999; Liu *et al.,* 2003; Jiang *et al.,* 2006), caballos (McKellar y Varma, 1996), pollos (Afifi y El-Sooud, 1997; Anadón *et al.,* 2008), patos (El-Banna, 1998), pez gato (*Ictalurus punctatus*) (Gaunt *et al.,* 2011), perros (Park *et al.,* 2008; Birdane y Birdane, 2015) y conejos (El- Aty *et al*., 2004; Park *et al.,* 2007; Koc *et al.,* 2009). Además, se han realizado estudios sobre la farmacocinética de FFC en camélidos como alpacas (Holmes *et al.,* 2012) y camellos (Ali *et al.,* 2003). Por último, también se ha estudiado en primates (*Macaco reshus*) (Cook *et al.,* 2004).

En cuanto al proceso de absorción de FFC, se describe una tasa de absorción prolongada posterior a su administración oral en terneros (Adams *et al.,* 1987), mientras que en especies monogástricas como el conejo se ha descrito una absorción gastrointestinal rápida evidenciada por valores de $T_{máx}$ de 0,90 ± 0,38 h (Park *et al.,* 2007). De igual forma en perros, la absorción de FFC es rápida obteniéndose valores de $T_{máx}$ de 0,94 h (Park *et al.,* 2008).

En especies de rumiantes como cabras se han descrito valores de biodisponibilidad de un 86,2% posterior a la administración IM de FFC (Atef *et al.,* 2001). En equinos también se describen valores altos de biodisponibilidad de FFC, luego de su administración vía IM y oral de 81% y 83%, respectivamente (McKellar y Varma, 1996). Por otro lado, en conejos se describen valores de biodisponibilidad levemente inferiores de un 76,23% (Park *et al.,* 2007) y 50,79% posterior a la administración oral del FFC (El-Aty *et al.,* 2004), mientras que en perros los valores de biodisponibilidad son elevados, de 95,43% (Park *et al.,* 2008). En primates no humanos (*Macaco Rhesus*), se ha descrito una amplia variabilidad en la absorción de FFC posterior a su administración IM (Cook *et al.,* 2004), con un rango de variación de las concentraciones máximas que fluctuó entre 6,8 y 44,2 µg/mL.

Respecto a la distribución de FFC, en conejos se ha descrito una extensa distribución de FFC en los tejidos corporales, lo que se evidencia mediante elevados valores de volumen de distribución en el equilibrio (Vd_{ss}) de 0,98 L/Kg posterior a su administración IV (Koc *et al.,* 2009). Asimismo, en perros, FFC es rápida y ampliamente distribuido con valores de volumen de distribución de 1,45 L/kg (Park *et al.,* 2008), similar a lo que ocurre en cerdos, donde se describe un Vd_{ss} de 1,5 L/kg (Jiang *et al.,* 2006). En rumiantes se han descrito valores de Vd_{ss} de 0,87 L/kg (Adams *et al.,* 1987), y de 0,76 L/kg en terneros (Lobell *et al.,* 1994), que también indican una amplia distribución del fármaco. En ovinos se han descrito valores de Vd_{ss} superiores con 1,86 L/kg (Jianzhong *et al.,* 2004) y en cabras de 1,68 L/kg (Atef *et al.,* 2001).

El metabolismo de FFC difiere entre las distintas especies animales; en anterior estudio del presente grupo de investigación, en ovinos se observó una proporción de metabolito

FFC-a (%) determinada por la razón $AUC_{0-\infty}$ FFC-a/$AUC_{0-\infty}$ FFC (%) de 14,0 % posterior a la administración IV de FFC (Palma *et al.,* 2011), mientras que en conejos se ha evidenciado un mayor metabolismo de FFC determinado por una razón de metabolito FFC-a de 63,03 % (Park *et al*., 2007).

En cuanto a su excreción, también se reportan diferencias en los valores de *clearance* de FFC, encontrándose en perros que estos valores alcanzan promedios de 1,03 L/kg/h (Park *et al.,* 2008), mientras en conejos se describen valores de 0,56 ± 0,02 L/kg/h (Koc *et al.,* 2009). En ovinos se describen promedios menores de 0,26 ± 0,03 L/kg/h (Jianzhong *et al.,* 2004), similares a los promedios observados en terneros (0,22 ± 0,05 L/kg/h) (De Craene *et al.,* 1997), dando cuenta de una mayor capacidad en el perro y conejo para eliminar este antibiótico, respecto a rumiantes como ovinos y terneros. En cabras se describen valores de *clearance* mayores que en los demás rumiantes: 0,55 L/kg/h (Atef *et al.,* 2001) mientras que en cerdos el *clearance* de FFC es similar a los valores descritos en terneros; de 0,23 L/kg/h (Jiang *et al.,* 2006).

En perros FFC es eliminado rápidamente del organismo, lo que se evidencia a través de su vida media de eliminación ($t_{1/2el}$) de 1,11 h (Park *et al.,* 2008). Al igual que en conejos donde la $t_{1/2el}$ es de 0,90 h (Park *et al.,* 2007). En otras especies como alpacas donde también se ha estudiado la farmacocinética del FFC se describen valores de $t_{1/2el}$ de 17,59 h posterior a su administración IM (Holmes *et al.,* 2012). Estos valores son similares a los descritos en bovinos, posterior a la administración IM de FFC, donde el $t_{1/2el}$ obtenido es de 18,3 h (Lobell *et al.,* 1994).

En la Tabla 1 se resumen algunos parámetros farmacocinéticos de FFC obtenidos en diferentes especies animales posterior a su administración vía IV. Los valores de volumen de distribución se aprecian extensos en general en todas las especies, destacándose promedios elevados en cerdos, conejos, camellos, equinos, cabras y ovinos. La vida media de eliminación de FFC es mayor en bovinos y cerdos, en comparación a otras especies como conejos y ovinos, donde la vida media de eliminación es menor. Se observan valores de *clearance* elevados en conejos, cabras y equinos.

Se han realizado algunos estudios comparativos de la farmacocinética de FFC entre distintas especies animales; en la investigación de Ismail y El-Kattan (2009), se estudió la farmacocinética de FFC en aves, tales como palomas, pollos y codornices, obteniéndose resultados similares respecto a la distribución de FFC. Sin embargo, los promedios de vida media de eliminación y área bajo la curva (AUC) fueron diferentes entre estas especies, por lo cual los autores recomiendan no extrapolar información de dosis desde pollos a las otras dos especies sin considerar la información farmacocinética. También se ha estudiado comparativamente la farmacocinética de FFC entre camellos, ovejas y cabras (Ali *et al.,* 2003), donde se observó que el *clearance* de FFC es similar entre ovinos y cabras, en cambio la tasa de absorción tiende a ser más alta en camellos.

Tabla 1. Parámetros farmacocinéticos de florfenicol en diferentes especies animales posterior a su administración intravenosa (IV).

Especie	Dosis (mg/kg)	$t_{½\beta}$ (h)	Cl (L/kg/h)	Vd (L/kg)	Referencia
Ovinos	40	1,01	0,36	0,50	Lane *et al*., 2004
	30	1,59	0,25	1,71	Jianzhong *et al.,* 2004
	20	1,31	0,30	0,69	Ali *et al.,* 2003
Cabras	20	1,19	0,27	0,57	Ali *et al.,* 2003
	20	2,61	0,55	1,68	Atef *et al.,* 2001
Bovinos	20	3,18	0,22	0,95	De Craene *et al.,* 1997
	11	3,7	0,17	0,87	Adams *et al.,* 1987
	20	2,65	0,22	0,77	Lobell *et al.,* 1994
	50	3,15	0,15	0,62	Bretzlaff *et al.,* 1987
Camellos	20	1,49	0,33	0,89	Ali *et al.,* 2003
Equinos	22	1,83	0,35	0,72	McKellar y Varma, 1996
Cerdos	20	2,63	0,31	0,95	Liu *et al.,* 2003
	20	6,7	0,23	1,5	Jiang *et al.,* 2006
Conejos	30	1,54	0,34	0,57	El Aty *et al.,* 2004
	20	0,90	0,63	0,94	Park *et al.,* 2007
	25	1,21	0,56	0,98	Koc *et al.,* 2009

$t_{½\beta}$: Vida media de eliminación, Cl: *Clearance* corporal total, Vd: Volumen de distribución.
Fuente: Extraído y modificado de Lashev y Haritova, 2006.

1.5 Farmacocinética de Florfenicol en ovinos y conejos.

En ovinos, distintos estudios han evaluado la farmacocinética de FFC a través de su administración por distintas vías (IM, SC, IV) (Ali *et al.,* 2003; Jianzhong *et al.,* 2004; Lane *et al.,* 2004; Palma *et al.,* 2011), la cual presenta diferencias respecto a la farmacocinética de FFC en conejos, donde esta se ha estudiado posteriormente a la administración IV de FFC (El-Aty *et al.,* 2004; Park *et al.,* 2007; Koc *et al.,* 2009), vía oral (El-Aty *et al.,* 2004; Park *et al.,* 2007) y también vía IM (El-Aty *et al.,* 2004; Koc *et al.,* 2009).

En cuanto a la absorción de FFC se ha descrito que es rápida en conejos posterior a su administración por vía oral; Park *et al.* (2007) describen que la $C_{máx}$ de FFC se alcanza antes de la primera hora posterior a su administración. En ovinos no existen antecedentes de la administración de FFC vía oral; sin embargo, puede deducirse la ocurrencia de variaciones en las tasas de absorción de FFC, debido a interacción con el material particulado del rumen como ocurre en terneros (Adams *et al.,* 1987). En cuanto a la absorción IM de FFC que se ha estudiado en ambas especies, en conejos se alcanzan las $C_{máx}$ a las 1,56 h (Koc *et al.,* 2009), mientras que en ovinos las $C_{máx}$ se alcanzan a las 1,45 h (Jianzhong *et al.,* 2004).

Las $C_{máx}$ descritas para FFC en conejos posterior a su administración vía oral, son del orden de 7,96 µg/mL (Park *et al.,* 2007), levemente inferiores a los valores promedio de 8,65 µg/mL descritos para la vía IM (Koc *et al.,* 2009). Por otro lado, en ovinos tratados con dosis de 20 mg/kg y 30 mg/kg de FFC vía IM se han descrito promedios de $C_{máx}$ que

fluctúan entre 4,13 y 7,01 µg/mL respectivamente, los cuales son inferiores a los descritos en conejos (Jianzhong *et al.,* 2004).

La biodisponibilidad IM de FFC es alta en conejos, con rangos entre 88,25% (El-Aty, *et al.,* 2004) y 88,75% (Koc *et al.,* 2009); mientras que en ovinos los valores de biodisponibilidad fluctúan más ampliamente entre 65,82% (Ali *et al.,* 2003) y 89,04% (Jianzhong *et al.,* 2004). Sin embargo, la biodisponibilidad oral en conejos es bastante menor que por vía IM, con valores descrito del orden de 50,79% (El-Aty, *et al.,* 2004), resultados que sugieren que FFC se absorbe solo parcialmente desde el tracto gastrointestinal, sufriendo un grado de metabolismo hepático de primer paso (El-Aty, *et al.,* 2004).

Respecto al tiempo medio de residencia (TMR) de FFC, en conejos se han descrito valores de 1,50 h (Park *et al.,* 2007), los que son inferiores al TMR de 2,34 h descrito en ovinos por Ali *et al.* (2003).

Sobre el metabolismo de FFC, como fue descrito anteriormente, existe evidencia que se produce una mayor biotransformación de FFC en conejos respecto a ovinos, considerando los mayores promedios de proporción de metabolito FFC-a observados en los conejos.

Asimismo, se ha investigado que la glicoproteína P (P-gp) y la enzima CYP3A perteneciente al complejo enzimático del CYP450 cumplen un rol en la disposición de FFC en conejos. Al respecto, existen antecedentes de la expresión en conejos de la enzima del citocromo CYP3A (Guerre *et al.,* 2000). Un estudio realizado por Liu *et al.* (2011), evaluó la participación de esta enzima en el metabolismo de FFC en conejos.

Para investigar el rol de estas enzimas en el metabolismo de FFC, se administró FFC en conjunto con ketoconazol como inhibidor de la enzima CYP3A, o fluvoxamina inhibidor de la CYP1A2, además de verapamilo como inhibidor de la glicoproteína P. Las $C_{máx}$ obtenidas en los grupos de FFC + verapamilo, FFC + ketoconazol y FFC + fluvoxamina fueron superiores a las obtenidas en el grupo control que recibió solo FFC, así como también, los valores de AUC fueron significativamente mayores en los grupos que recibieron verapamilo y ketoconazol. Además, los valores de *clearance* (Cl/F), fueron significativamente menores en los grupos donde se administraron los inhibidores de la enzima CYP3A y P-gp, respecto al grupo control tratado con FFC, lo que indica que el transporte y metabolismo de FFC se vio inhibido por la acción de estos fármacos (Liu *et al.,* 2011).

Respecto a la vida media de eliminación de FFC, posterior a su administración IV, se reportan diferencias en la $t_{1/2el}$, siendo esta mayor en ovinos (18,83 ± 6,76 h) (Jianzhong *et al.,* 2004), que, en conejos, describiéndose en estos últimos valores de 1,21 ± 0,09 h (Koc *et al.,* 2009) y 1,54 ± 0,51 h (El-Aty *et al.,* 2004).

1.6 Florfenicol amina.

La FFC-a es el principal metabolito resultante de la biotransformación de FFC en la mayoría de las especies domésticas (EMA, 1999; Li *et al.,* 2006; Park *et al.,* 2008), y el de mayor persistencia en hígado de bovino (Xie *et al.,* 2011), por lo que se utiliza como residuo marcador para el cálculo de los períodos de resguardo de FFC (EMA, 1999). Además, FFC-a se utiliza para fijar los límites máximos de residuos (LMR) de este

antibiótico en tejidos comestibles animales, donde se considera la suma de FFC y FFC-a como residuo marcador para fijar los LMR (EMA, 2002).

Las concentraciones de este metabolito, así como también de FFC, pueden cuantificarse por medio de técnicas analíticas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), el cual es un método relativamente rápido, preciso y confiable, que posee automatización y permite la detección de diversos fármacos que pueden constituir residuos en productos de consumo humano (Toldra y Reig, 2006).

1.7 Farmacocinética de Florfenicol amina.

Respecto a la farmacocinética de FFC-a, los antecedentes existentes son escasos. Se han realizado estudios que miden sus concentraciones en animales domésticos como conejos (Park *et al.,* 2007), pollos (Anadón *et al.,* 2008), perros (Park *et al.,* 2008) y ovinos (Palma *et al.,* 2011). También se ha investigado la farmacocinética de FFC-a en peces (Park *et al.,* 2006; Feng *et al.,* 2016) y anguilas (Xie *et al.,* 2013).

En conejos tratados con FFC vía IV se describen valores de $C_{máx}$ de FFC-a de 5,06 ± 1,79 µg/mL alcanzados en un $T_{máx}$ de 0,88 ± 0,78 h (Park *et al.,* 2007), estos valores son similares a los obtenidos en perros donde se observaron valores de $C_{máx}$ de 5,67 ± 2,47 µg/mL y $T_{máx}$ de 1,19 ± 0,55 h (Park *et al.,* 2008). Respecto a la vida media de eliminación de FFC-a, en conejos después de la administración IV de FFC, esta fue de 1,84 ± 0,17 h (Park *et al.,* 2007), en cambio en perros se reportan valores de 2,26 ± 0,90 h (Park *et al.,* 2008), lo que indica que en conejos la eliminación de FFC-a es más rápida.

Un estudio previo de nuestro laboratorio describe antecedentes de farmacocinética de FFC-a en ovinos, donde se observaron valores de $C_{máx}$ de 2,9 ± 2,8 µg/mL, posterior a la administración IV de FFC (Palma *et al.,* 2011), los que son menores a los valores de $C_{máx}$ observados en perros (Park *et al.,* 2008) y conejos (Park *et al.,* 2007). Los valores de $T_{máx}$ de FFC-a en ovinos fueron de 2,9 ± 2,1 h (Palma *et al.,* 2011), los cuales son mayores a los observados para $T_{máx}$ en conejos y perros, descritos anteriormente. Esto indica que existe un mayor metabolismo de FFC en especies monogástricas como conejos y perros en comparación a los ovinos, debido a las mayores concentraciones plasmáticas de FFC-a encontradas en estas dos especies.

La vida media de eliminación de FFC-a en ovinos fue de 17,3 ± 10,7 h (Palma *et al.,* 2011), valores superiores a los mencionados anteriormente en conejos (Park *et al.,* 2007) y perros (Park *et al.,* 2008). Esta eliminación más lenta del metabolito FFC-a desde los ovinos, podría explicarse por las diferencias en el pH urinario entre las especies, donde la orina más alcalina de los rumiantes podría retrasar la excreción urinaria de FFC-a (Palma *et al.,* 2011).

La FFC-a también ha sido detectada en animales posterior a la administración oral de FFC. En conejos (Park *et al.,* 2007), se describen valores de $C_{máx}$ de 3,38 µg/mL alcanzados a las 2,10 h (Park *et al.,* 2007). Por su parte en pollos, luego de la administración de una dosis única de 20 mg/kg de FFC vía oral, la $C_{máx}$ fue de 2,41 µg/mL a las 1,16 h (Anadón *et al.,* 2008). En perros, luego de la administración oral de FFC, la $C_{máx}$ de FFC-a fue de 3,64 µg/mL a las 2,13 h, muy similar a lo que ocurre en conejos. Los valores de AUC de FFC-a fueron 17,86 mg*h/L en contraste con 29,84 mg*h/L obtenido luego de la administración IV (Park *et al.,* 2008). Es posible diferenciar que

luego de la administración oral de FFC los valores de $C_{máx}$ y AUC de FFC-a son inferiores a los obtenidos luego de la administración IV de FFC, lo cual es esperado debido a las mayores interferencias en el proceso de absorción que se observan luego de la administración oral de un fármaco (Park *et al.,* 2008).

Por otra parte, al estudiar la persistencia de residuos de FFC-a en tejidos de ovinos, se describen vidas medias en los diferentes tejidos de 10,3 días en hígado; 14,8 días en músculo; 7,7 días en riñón y 15,6 días en grasa (Lane *et al.,* 2007).

2. RESPUESTA INFLAMATORIA AGUDA EN ENFERMEDAD.

2.1 Características y componentes fisiológicos de la RIA.

El organismo animal se ve enfrentado a la amenaza de distintos agentes patógenos que pueden causar desde un pequeño daño, hasta complejas enfermedades e incluso la muerte. Para hacer frente a la enorme variedad de microorganismos infecciosos presentes en el medio ambiente los animales deben valerse de su sistema inmunológico, el cual es de vital importancia para proteger al organismo y evitar la ocurrencia de múltiples y letales infecciones que ocurrirían de no estar este presente.

Dentro del sistema inmune, como primera línea de defensa frente a infecciones se encuentra la respuesta inmune innata (Aderem y Ulevitch, 2000; Akira *et al.,* 2006). Esta es de acción temprana y participan distintos elementos celulares que conforman mecanismos moleculares capaces de reconocer y atacar los agentes extraños (Akira *et al.,* 2006; Cray *et al.,* 2009). La inmunidad innata permite montar una respuesta defensiva rápida e inmediata, donde participan células sanguíneas de la serie blanca

como neutrófilos y macrófagos que fagocitan y destruyen los patógenos y pueden al mismo tiempo sintetizar una amplia variedad de mediadores inflamatorios como citoquinas (Aderem y Ulevitch, 2000). Otros componentes celulares que participan de la inmunidad innata son las células dendríticas, mastocitos, eosinófilos y células *natural killer* (NK) (Turvey *et al.,* 2010), además de barreras físicas del organismo, sistema del complemento y receptores tipo-Toll, que contribuyen a prevenir las infecciones y eliminar los potenciales patógenos (Cray *et al.,* 2009).

Como componente del sistema inmune innato de defensa temprana se encuentra la respuesta de fase aguda (RFA), que corresponde a una etapa del proceso inflamatorio, (Peatman *et al.,* 2007; Cray *et al.,* 2009), que puede ser originada por diferentes estímulos como trauma, estrés, neoplasia, infecciones o inflamación (Carroll *et al.,* 2009; Cray *et al.,* 2009), formando parte de una respuesta inflamatoria aguda (RIA).

En presencia de daño tisular, inflamación o invasión de microorganismos patógenos, en los mamíferos ocurren un conjunto de cambios fisiológicos y metabólicos (Van Miert, 1995; Peatman *et al.,* 2007) con la finalidad de reestablecer la homeostasis y promover la curación del organismo, eliminando la causa de su alteración (Ebersole y Cappelli, 2000; Cray *et al.,* 2009). Estos cambios, se establecen de manera temprana e inespecífica frente a una herida o infección, protegiendo contra elementos bacterianos como endotoxinas (Ebersole y Cappelli, 2000). Entre las características y cambios fisiológicos y metabólicos que ocurren en la RIA se encuentran: fiebre, leucocitosis con neutrofilia, disminución de los niveles sanguíneos de fierro, zinc y cobre, incremento de la gluconeogénesis, incremento del catabolismo proteico muscular e inducción de la síntesis de proteínas de fase aguda (Ebersole y Cappelli, 2000; Cerón *et al.,* 2005;

Carroll *et al.,* 2009). También se produce letargia, disminución del comportamiento agresivo y social, inapetencia, inhibición de la función gástrica, taquicardia (Van Miert, 1995; Carroll *et al.,* 2009) y cambios en el flujo sanguíneo a varios órganos (Van Miert, 1990). Además, la RIA se caracteriza por activación del sistema del complemento y vías de la coagulación, disminución del conteo de eritrocitos, aumento del número de plaquetas circulantes y activación de linfocitos (Van Miert, 1995; Ebersole y Cappelli, 2000). La intensidad de estos efectos puede variar dependiendo del tipo de microorganismo invasor o de la toxina bacteriana que haya sido administrada de forma experimental (Van Miert, 1995; Freire y Van Dike, 2013).

Los macrófagos tisulares son considerados las células que comúnmente inician la respuesta inflamatoria aguda a través de la estimulación directa y secreción de variados factores de comunicación celular (Ebersole y Cappelli, 2000). Sin embargo, también participan otros tipos celulares como leucocitos polimorfonucleares, plaquetas, linfocitos T, células endoteliales y fibroblastos (Koj, 1996). Los leucocitos circulantes juegan un rol crucial en el inicio de la RIA en todas las enfermedades relacionadas con la sepsis (Salvesen *et al.,* 2016). Los macrófagos activados liberan una amplia variedad de mediadores, dentro de los que se encuentran radicales libres, especies reactivas del oxígeno (peróxido, óxido nítrico), derivados lipídicos (prostaglandina E2, tromboxano A2, factor activador de plaquetas) y diversas proteínas reguladoras conocidas como citoquinas (Koj, 1996). Las citoquinas incluyen moléculas de diversa naturaleza como interleuquinas, interferones y factores de crecimiento y diferenciación, además de las quimioquinas, que cumplen la función quimiotáctica de controlar la migración de distintas células del sistema inmune (neutrófilos, monocitos, macrófagos y linfocitos) al sitio de

infección, sin embargo, pueden agruparse bajo una definición común de proteínas solubles, no inmunoglobulinas, liberadas por células del hospedador que actúan de manera no enzimática en concentraciones de picomolar a nanomolar, para regular la función celular del hospedador (Koj, 1996; Tisoncik *et al.,* 2012). Estos compuestos, son polipéptidos o glicoproteínas de bajo peso molecular secretadas por leucocitos y otras células en respuesta a diversos estímulos (Gomes *et al.,* 2016).

En este proceso puede ocurrir en primer lugar, una reacción localizada que se manifiesta en forma de inflamación aguda, mientras que la reacción sistémica incluye alteraciones de tipo metabólicas y endocrinas, las cuales se evidencian por medio de fiebre, leucocitosis y una reorganización importante de la síntesis de proteínas de fase aguda (Koj, 1996). Generalmente, la respuesta inflamatoria aguda tiene un carácter beneficioso al contribuir a restablecer la homeostasis que fue alterada por el daño, y así tratar de remover la causa de ésta (Ebersole y Cappelli, 2000). Sin embargo, puede llegar a ser perjudicial, si la liberación de mediadores inflamatorios es excesiva, pudiendo causar daño o incluso tener efectos letales a través del shock séptico (Koj, 1996) o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) (Balk, 2014).

2.2 Rol de las citoquinas proinflamatorias en la RIA.

Un rol crucial dentro de la RIA lo cumplen las citoquinas, ya que están involucradas en la respuesta del organismo hospedador frente a la infección. La producción y liberación de las citoquinas proinflamatorias, tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), interferones (IFNs) e interleuquinas (ILs), desencadenan los efectos sistémicos que conforman la RIA (Van Miert, 1995; Monshouwer *et al.,* 1996). Específicamente, se han

identificado como citoquinas pirógenas, dentro de las cuales se encuentran interleuquinas, interferones y factor de necrosis tumoral. Estas citoquinas son derivadas de las células reticuloendoteliales y fagocitos. Una vez liberadas a la circulación estas citoquinas pirógenas viajan desde sitios periféricos de infección, inflamación o daño, hacia estructuras cerebrales, como el centro termorregulador del hipotálamo para iniciar la fiebre (Van Miert, 1990; Evans *et al.,* 2015).

Las citoquinas pueden clasificarse de diferentes formas, una de ellas es la clasificación en tres grupos: A) citoquinas proinflamatorias: TNF-α, interleuquina 1 (IL-1), interferón-γ, e IL-8, las que inician o amplifican la cascada de eventos; B) citoquinas del tipo interleuquina-6: IL-6, IL-11, factor neurotrófico ciliar y cardiotrofina-1, responsables de las principales características sistémicas de la respuesta inflamatoria aguda en diversos tejidos y C) citoquinas antiinflamatorias que regulan a la baja la respuesta inflamatoria aguda (IL-10, IL-4, IL-13 y factor de crecimiento transformante β) (Ebersole y Cappelli, 2000).

Las citoquinas participan induciendo efectos locales y sistémicos, a nivel local las citoquinas potencian el proceso inflamatorio mediante la inducción de enzimas como la ciclooxigenasa 2 (COX-2) y la, óxido nítrico sintetasa (NOS). La enzima COX-2 media la transformación del ácido araquidónico en prostaglandinas como prostaglandina E2 (PGE_2), prostaciclina I2 (PGI_2) y en tromboxanos (TXA_2), mientras que NOS induce la producción de óxido nítrico, el cual causa daño celular generando un ambiente oxidativo (Moses y Bertone, 2002). Por otro lado, la respuesta sistémica se manifiesta con fiebre, leucocitosis, niveles incrementados en circulación de distintas citoquinas, activación de las vías de la ciclooxigenasa y lipooxigenasa, así como la activación del complemento y

coagulación (Koj, 1998; Cray *et al*., 2009; Cavaillon, 2018). La liberación de las citoquinas proinflamatorias, además de estimular la aparición de la RIA, altera rápidamente la síntesis de proteínas de fase aguda en el hígado, como será descrito más adelante (Koj, 1998; Peatman *et al.,* 2007).

Por otra parte, si se consideran otros mediadores moleculares, la RIA es desencadenada por la aparición de compuestos intermediarios reactivos del oxígeno y otros radicales libres, cambios en la osmolaridad, pH y contenido iónico de las células que activan proteínas kinasas sensibles a estos estímulos en macrófagos y otras células (Koj, 1998; Closa y Folch-Puy, 2004). Radicales libres del oxígeno participan en la activación de factores nucleares como NF-κB, el que induce la síntesis de citoquinas, en fases iniciales de una respuesta inflamatoria sistémica. En fases más tardías pueden activarse células endoteliales debido a la interacción entre radicales libres y citoquinas, promoviendo la síntesis de mediadores inflamatorios y moléculas de adhesión. Los radicales libres también pueden causar daño celular y eventual muerte de las células, como lo que ocurre en un SRIS (Closa y Folch-Puy, 2004).

Por otro lado, en años más recientes se ha descrito un término que involucra a las citoquinas llamado “tormenta de citoquinas” del inglés *cytokine storm,* el cual hace referencia a un sistema inmune y una respuesta inflamatoria descontrolada, donde ocurre la liberación excesiva de distintas citoquinas como interferones (IFN-α, IFN-β e IFN-γ), interleuquinas (IL-1α, IL-1β, IL-8, IL-2, IL-6), quimioquinas (CCL2, CXCL10, CXCL9 y CCL4), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), y TNF-α (Tisoncik *et al.,* 2012). Dentro de las citoquinas liberadas durante una tormenta

de citoquinas se ha dado especial importancia a IL-6, ya que el exceso de liberación de ella se ha asociado con desarrollo de SRIS (Aliyu *et al.,* 2022).

Estas tormentas de citoquinas se asocian con distintas enfermedades infecciosas y no infecciosas, dentro de las cuales se encuentran infecciones virales como influenza y el síndrome de disfunción orgánica múltiple. En la patogenia de esta tormenta de citoquinas la inflamación comienza a nivel local y se expande por el organismo a través de la circulación, pudiendo generar daño severo a órganos como daño agudo al pulmón (Tisoncik *et al.,* 2012), describiéndose incluso en el síndrome respiratorio agudo severo causado por coronavirus tipo 2 (SARS-CoV-2) (Hu *et al.,* 2021).

La tormenta de citoquinas también puede generarse a causa de infecciones severas, en sitios como el tracto gastrointestinal, sistema urinario, sistema nervioso central o articulaciones, y ocurre mediante mecanismos mediados por una desregulación en las respuestas transcripcionales e hiperreactividad de receptores tipo TLR, que recaen en la sobreproducción de citoquinas (Tisoncik *et al.,* 2012, Cavaillon, 2018).

2.3 Función de proteínas de fase aguda en RIA.

En la RIA el organismo responde incrementando la producción hepática de proteínas de fase aguda (PFA), las que luego son liberadas a la circulación. Esta síntesis se encuentra regulada principalmente por citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 y TNF-α (Eckersall, 2004; Cerón *et al.,* 2005; Bagga *et al.,* 2016). Las PFA son proteínas sanguíneas sintetizadas mayormente por los hepatocitos, como parte de la RIA, y varían sus concentraciones en respuesta al estado inflamatorio en los animales (Cray *et al.,* 2009; Bagga *et al.,* 2016).

El incremento en las concentraciones plasmáticas de las PFA en el sitio del daño tiene un rol fundamental en el proceso de recuperación de una herida o lesión. Estas proteínas cumplen importantes funciones en la inhibición de proteasas extracelulares, coagulación sanguínea, fibrinolisis, modulación de la función inmune celular, neutralización y *clearance* de componentes dañinos de la circulación (Ebersole y Cappelli, 2000; Cray, 2012). Las PFA participan del restablecimiento de la homeostasis posterior a una infección o inflamación, contribuyendo a limitar el crecimiento microbiano (Murata *et al.,* 2004), esto incluye funciones hemostáticas (como el fibrinógeno), propiedades antitrombóticas (glicoproteína ácida- α1) y antiproteolíticas (α2-macroglobulina, antitripsina-α1) (Ebersole y Cappelli, 2000). La proteína C-reactiva posee funciones fagocíticas y microbicidas (Ebersole y Cappelli, 2000), y puede estimular la eliminación de patógenos mediante opsonización y activación del sistema del complemento (Schroedl *et al.,* 2003).

Las PFA tienen utilidad para el diagnóstico y pronóstico de distintas enfermedades en humanos y también en animales (Murata *et al.,* 2004; Cray *et al.,* 2009). Una de las principales PFA es la proteína C- reactiva (PCR) y fue la primera identificada, a comienzos de la década de 1930, en la sangre de humanos y primates no humanos infectados con *Streptococcus pneumoniae*. Hasta el día de hoy la PCR se mantiene como un indicador de gran interés en humanos, donde actúa como marcador de infección, enfermedades autoinmunes, trauma, malignidad y necrosis (Cray *et al.,* 2009). También se utiliza como referencia en experimentación animal y medicina veterinaria, por su función activadora de la respuesta inmune innata y respuesta inflamatoria (Eckersall y Bell, 2010). A nivel experimental puede utilizarse para evaluar los efectos de

agentes antiinflamatorios o antibióticos en modelos de inflamación sistémica (Saco y Bassols, 2023). Sus concentraciones séricas aumentan de manera pronunciada y rápida en respuesta a una infección o daño tisular (Ulutas y Ozpinar, 2006), por lo cual puede considerarse como biomarcador de utilidad en diagnóstico y pronóstico clínico (Eckersall y Bell, 2010; Cray, 2012).

La RIA puede desencadenar variaciones en los niveles de más de 200 proteínas, las que pueden agruparse como PFA positivas o PFA negativas (Cray *et al.,* 2009). En la mayoría de las especies animales la albúmina es la principal PFA negativa, la cual reduce sus concentraciones sanguíneas durante la RIA. Las PFA positivas son aquellas que incrementan sus niveles sanguíneos durante la RIA como la PCR y la α2-macroglobulina (Cray *et al.,* 2009).

Las PFA también pueden clasificarse de acuerdo con la magnitud de su incremento durante la RIA, en mayores, moderadas y menores (Cray *et al.,* 2009). Las PFA mayores incluyen la PCR, α2-macroglobulina y amiloide sérico A, estas aumentan sus niveles entre 10 y más de 100 veces; las PFA moderadas incrementan entre 2 y 10 veces su valor basal y entre ellas podemos encontrar la haptoglobina, fibrinógeno y α1-antitripsina; por último, las PFA menores incrementan solo levemente su valor y entre ellas se encuentra la ceruloplasmina y el componente C3 del complemento (Ebersole y Cappelli, 2000; Cray *et al.,* 2009).

En rumiantes, las principales PFA son la haptoglobina y amiloide sérico A, siendo consideradas como proteínas mayores en bovinos y ovinos. Entre las proteínas moderadas en bovinos se encuentran la glicoproteína ácida–α1, PCR y fibrinógeno

(Carroll *et al.,* 2009; Cray *et al.,* 2009), mientras que, en ovinos, dentro de las PFA moderadas destacan la glicoproteína ácida–α1 y PCR (Cray *et al.,* 2009). En conejos, las principales PFA mayores son haptoglobina y amiloide sérico A, y entre las PFA moderadas destacan glicoproteína ácida–α1, proteína C-reactiva y fibrinógeno (Syin *et al.,* 1986; Cabana *et al.,* 1989; Cray *et al.,* 2009).

2.4 Cambios fisiológicos durante la RIA.

Los cambios fisiológicos que ocurren durante la patogenia de la RIA son gatillados por la liberación de IL-1, IL-6 y TNF-α desde células inflamatorias, como macrófagos, y en menor grado por neutrófilos, constituyendo una reacción inflamatoria a nivel local inicialmente (Paltrinieri, 2008). Estas citoquinas inducen fiebre, leucocitosis y liberación de PFA a la circulación sistémica (Paltrinieri, 2008; Cray, 2012). La inflamación inicial actúa como un mecanismo de defensa siendo una de las principales reacciones generadas frente a una injuria (Witkamp y Monshouwer, 2000). Esta respuesta inflamatoria local se inicia con la liberación de varios mediadores solubles como sustancia P, histamina, serotonina, prostaglandinas, entre otros, a partir de varios tipos celulares activados por los microorganismos patógenos (Witkamp y Monshouwer, 2000; Blatteis, 2006). Estos mediadores causan cambios en la permeabilidad vascular local, produciéndose la entrada de factores circulantes solubles hacia el espacio extravascular (Blatteis, 2006; Freire y Van Dyke, 2013). Entre estos factores se encuentran inmunoglobulinas, componentes del complemento y de sistemas fibrinolíticos que se activan al estar en contacto con los patógenos y sus componentes como LPS en el sitio inflamatorio. Sus derivados activos como bradiquinina o componente C del complemento reclutan a fagocitos mononucleares como neutrófilos y macrófagos tisulares que ejercen

fagocitosis y liberan citoquinas y otros mediadores como leucotrienos que incrementan el proceso inflamatorio (Blatteis, 2006; Freire y Van Dyke, 2013). Estos efectos se ven aumentados por otros compuestos como enzimas proteolíticas y especies reactivas del oxígeno. Al mismo tiempo actúan factores reguladores como IL-4, IL-6 y IL-10, y TGF-β que cumplen el rol de controlar la respuesta aguda. Si el estímulo infeccioso persiste, los mediadores drenan desde el área inflamada mediante los vasos linfáticos y sanguíneos, y los efectos inflamatorios locales se extienden a todo el organismo originando la RIA (Witkamp y Monshouwer, 2000; Blatteis, 2006).

Ocurre también una reacción febril, que se considera como el signo más característico y manifiesto de la RIA, que corresponde a una respuesta del hospedador frente a la invasión de microorganismos patógenos y no patógenos, y le otorga el sello distintivo a la infección (Blatteis, 2006; Roth y Blatteis, 2014). La fiebre endotoxémica está regulada por factores endógenos que entregan señales pro y antipiréticas, desde la periferia hacia estructuras cerebrales (Blatteis, 2006).

En el modelo clásico de patogenia de la fiebre su inducción es mediada por la liberación de citoquinas pirógenas como TNF, IL-1, IL-6 e interferones a la circulación sanguínea en respuesta a pirógenos exógenos (Netea *et al.,* 2000). Estos mediadores actúan a nivel de la lámina terminal en el sistema nervioso central induciendo la síntesis de prostaglandinas que son los mediadores centrales de la respuesta que conduce a la fiebre y conducen a la elevación de la temperatura corporal (Netea *et al.,* 2000). Esta alza de la temperatura corporal es de utilidad para inhibir el crecimiento bacteriano, incrementar la actividad bactericida de macrófagos, estimular la síntesis de proteínas de fase aguda, todo lo cual tiene un importante rol adaptativo en la sobrevivencia del

hospedador frente a una infección (Saper y Breder, 1994; Netea *et al.,* 2000). Sin embargo, actualmente se conocen otros mecanismos mediante los cuales se genera el proceso febril, los cuales pueden originarse por múltiples vías que involucran a citoquinas, como la producción local de citoquinas que estimulan señales de fibras vagales o la liberación local de citoquinas en el hipotálamo por monocitos circulantes (Netea *et al.,* 2000).

También se describen otras formas mediante las cuales se genera la fiebre en el organismo en respuesta a la invasión de bacterias gram-negativas, en donde las citoquinas actúan de manera más tardía en la generación de la fiebre. De esta manera nuevas evidencias indican que la respuesta febril se inicia con la llegada al hígado de los patógenos, específicamente a las células de Kupffer, donde activan la cascada del complemento generando el componente 5a (Roth y Blatteis, 2014). Esto estimula a que las células de Kupffer liberen rápidamente prostaglandinas (PGE2), las que pueden ser transportadas por la circulación hasta el área preóptica-anterior del hipotálamo (POA) donde se ubica el *locus* del centro termorregulador (Blatteis, 2006). En otra vía de generación de fiebre, las PGE2 generadas por las células de Kupffer también pueden activar fibras aferentes vagales hepáticas que se proyectan al bulbo raquídeo y de ahí hasta el POA, vía el haz noradrenérgico ventral. La norepinefrina generada estimula adrenoreceptores alfa-1 en neuronas termoreguladoras lo que causa un aumento inicial de la temperatura interna. Esta vía neural en la generación de fiebre es más rápida que la activada por las PGE2 en el hipotálamo, por lo que la elevación de PGE2 en el POA ocurre más tarde generado un alza secundaria en la temperatura corporal interna (Blatteis, 2006; Roth y Blatteis, 2014).

Entre otros cambios fisiológicos que ocurren en la RIA, se encuentran importantes cambios hematológicos y en la bioquímica sanguínea. En bovinos cursando una RIA inducida por el LPS de *E. coli* se observó leucopenia seguida por leucocitosis, trombocitopenia, hipocalcemia, hipoferremia e hipozinquemia seguida de hiperzinquemia. Estos parámetros sufrieron importantes variaciones individuales entre los bovinos en estudio (Jacobsen *et al.,* 2005).

Los cambios en la serie blanca como leucocitosis ocurren debido a la liberación de células desde el pool marginal del endotelio vascular (Paltrinieri, 2008). Esto ocurre por la estimulación que ejercen las citoquinas sobre el eje hipotálamo-hipófisis- glándula adrenal, que deriva en la producción de cortisol. El cortisol causa el aumento del número de leucocitos circulantes al producir una disminución de la adherencia al endotelio de leucocitos maduros pertenecientes al pool marginal, los que se liberan y entran a la circulación (Paltrinieri, 2008). También puede ocurrir incremento de los leucocitos en circulación debido a la activación de la mielopoiesis a nivel de médula ósea, inducida por TNF-α e IL-1, lo que ocurre de manera más tardía, pero generando niveles más duraderos en la circulación sanguínea (Paltrinieri, 2008; Schultze *et al.*, 2019).

En ovinos que cursan una RIA inducida por LPS se ha observado que ocurre un aumento del volumen globular a las 2 y 4 h posterior a la administración de LPS (Yates *et al.,* 2011), contrariamente a la disminución de los niveles de eritrocitos que se describe comúnmente en la RIA (Ebersole y Cappelli, 2000). Este aumento se atribuye a la contracción esplénica que ocurre durante la RIA que libera eritrocitos a la circulación sanguínea (Yates *et al.,* 2011). En conejos se describe aumento del recuento sanguíneo

de leucocitos al inducir RIA mediante la inyección IV de IL-6, además de una disminución de los niveles sanguíneos de hierro y zinc (Sakata *et al.,* 1991).

En la Figura 3 se resume la fisiología de la RIA.

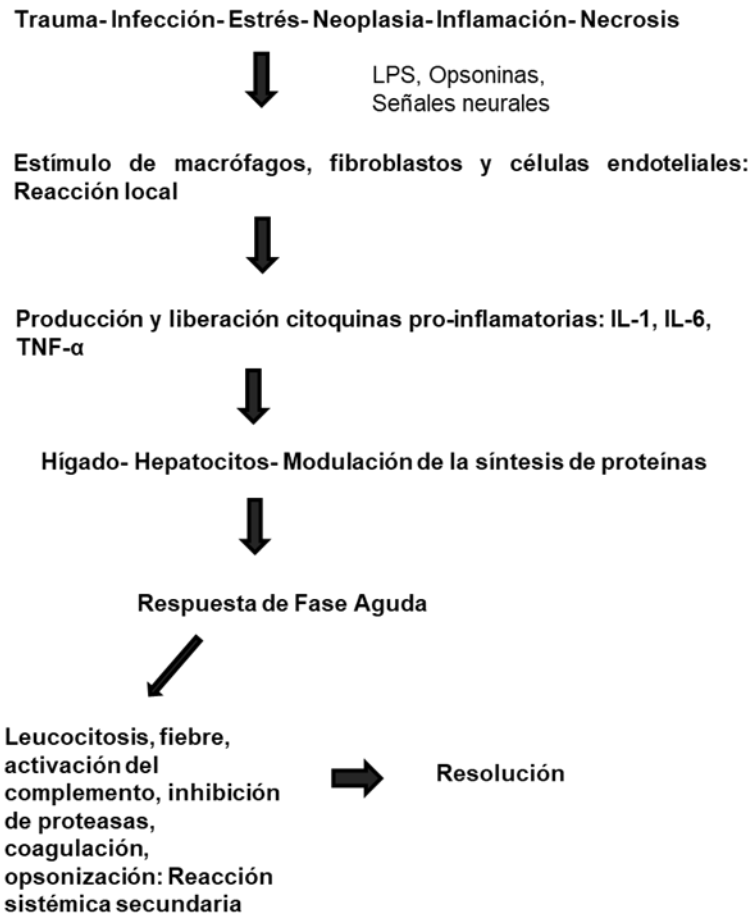

Figura 3. Resumen de la fisiología de la respuesta inflamatoria aguda. Fuente: Extraído y modificado de Ebersole y Cappelli (2000) y Cray *et al.* (2009).

2.5 Función del lipopolisacárido en la Respuesta Inflamatoria Aguda.

El LPS es un componente bacteriano presente en microorganismos patógenos que estimula la respuesta inmune innata (Aderem y Ulevitch, 2000). El LPS forma parte de los denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Aderem y Ulevitch, 2000; Janeway y Medzhitov, 2002), y es el principal componente de las bacterias gram-negativas que activa el sistema inmune innato, ejerciendo un profundo efecto sobre él, activándolo a concentraciones bajo 1nM (Aderem y Ulevitch, 2000). EL LPS al diseminarse en la circulación sanguínea causa fiebre, coagulación intravascular diseminada, estrés oxidativo, hipotensión, falla orgánica múltiple, y en casos más severos puede ocasionar shock séptico y la muerte (Elmas *et al.,* 2008).

El LPS es un componente de la membrana externa de bacterias gram- negativas y ha sido utilizado en modelos experimentales para inducir un modelo de inflamación local o generar un modelo de endotoxemia sistémica (Monshouwer *et al.,* 1996; Lu *et al.,* 2008). Más aún, el LPS es el agente inductor de fiebre que ha sido utilizado más frecuentemente en experimentación para caracterizar los procesos fisiológicos, inmunológicos y neuroendocrinos que subyacen tras la manifestación de la respuesta febril (Roth y Blatteis, 2014).

Mediante la administración de LPS es posible generar un modelo reproducible y controlado que permite estudiar los efectos de la RIA sobre la disposición plasmática y metabolismo de distintos fármacos (Monshouwer *et al.,* 1996; Rao *et al.,* 2000), en adición a esto, el modelo de fiebre inducido por el LPS de *E. coli* ha sido reconocido por la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos (EMA) como un método aceptable para el estudio del efecto antipirético de antiinflamatorios no esteroidales (De Boever *et al.,* 2010).

La estructura del LPS consiste típicamente en un dominio hidrofóbico conocido como lípido A (o endotoxina), un núcleo o *"core"* de oligosacárido y un polisacárido distal o antígeno O (Raetz y Withfield, 2002). El lípido A es la estructura que le otorga su función biológica al LPS y es capaz de inducir signos de inflamación al ser administrado en animales (Galanos *et al.,* 1985; Raetz y Withfield, 2002; Roth y Blatteis, 2014).

En la Figura 4 se muestran los distintos componentes que conforman el LPS.

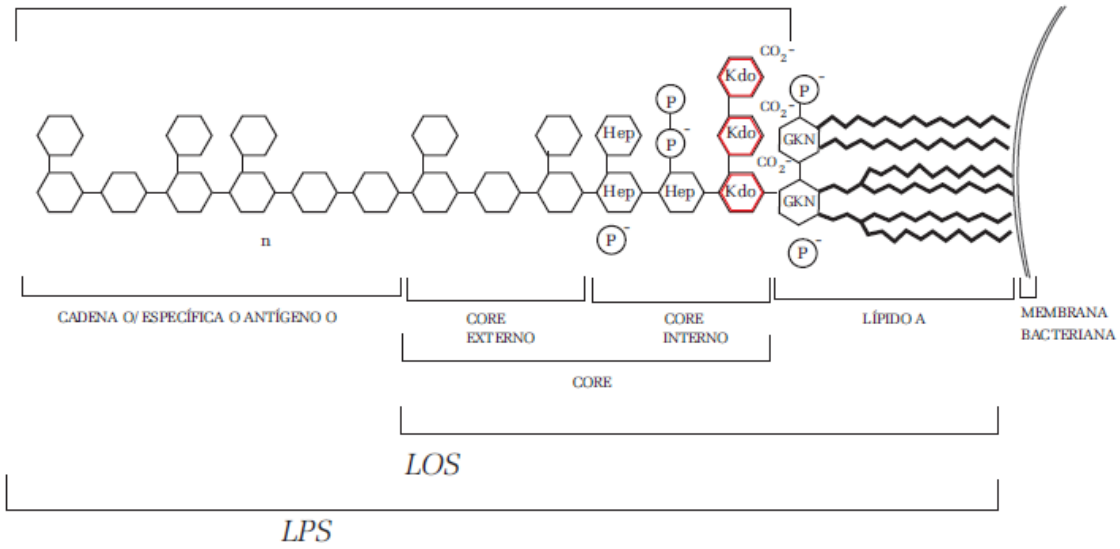

Figura 4. Estructura general del lipopolisacárido. Fuente: Extraído de Hurtado e Iregui, 2010.

2.6 Mecanismo de acción del LPS.

Al entrar el LPS al torrente sanguíneo y liberarse de la bacteria como consecuencia de la multiplicación o lisis, este entra en contacto con varias proteínas del organismo hospedador, entre las que destacan la proteína de unión a LPS (LBP; *LPS binding protein*) y los receptores CD14 (*Cluster of differentiation* 14), TLR4 (*Toll-like receptor-4*)

y proteína adaptadora de diferenciación mieloide 2 (MD-2) (Lu *et al.,* 2008). La proteína soluble LBP cumple el rol de capturar al LPS y formar el complejo LPS-LBP, facilitando la asociación del LPS con el receptor CD14, el cual se ubica en la superficie de macrófagos, monocitos, polimorfonucleares y células endoteliales o en forma soluble (Witkamp y Monshouwer, 2000; Akira *et al.,* 2007; Lu *et al.,* 2008). CD14 no posee dominio intracitoplasmático y su función principal es transferir el LPS al complejo encargado de su reconocimiento formado por TLR4 y MD-2 (TLR4/MD-2) (Hurtado e Iregui, 2010). El TLR4 es una proteína transmembrana denominada como receptor de reconocimiento de patrones (PRR) (Rosadini y Kagan, 2017). La MD-2 es una proteína soluble que se asocia con el receptor TLR4 para llevar a cabo la transducción de señales inducida por LPS (Hurtado e Iregui, 2010), una vez formado el complejo LPS-TLR4/MD2 el TLR4 experimenta una oligomerización y recluta a proteínas celulares que poseen dominios TIR (receptor toll de interleuquina -1) (Lu *et al.,* 2008). Estos dominios TIR son críticos para la transducción de señales por parte de TLR4 y median las interacciones proteína-proteína entre el TLR4 y las proteínas adaptadoras de transducción de señales del LPS. Entre estas proteínas adaptadoras que contienen dominios TIR se encuentran MyD88 (proteína de diferenciación mieloide) y TRIF (proteína adaptadora asociada al dominio TIR inductora de interferón) (Lu *et al.,* 2008). Las vías de transducción mediadas por el complejo LPS/TLR4 se denominan como dependiente de MyD88, e independiente de MyD88 o también conocida como dependiente de TRIF (Lu *et al.,* 2008; Hurtado e Iregui, 2010). Ambas coinciden en la activación del factor de transcripción nuclear NF-κB, el cual cumple un rol clave en la activación de genes proinflamatorios, como los que codifican para las citoquinas TNF-α y IL-1β (Van Miert, 2002; Lu *et al.,* 2008) si fue

activada la vía de MyD88, y en la activación de genes que codifican para interferones tipo I si fue activada la vía de TRIF (Lu *et al.,* 2008) (Figura 5).

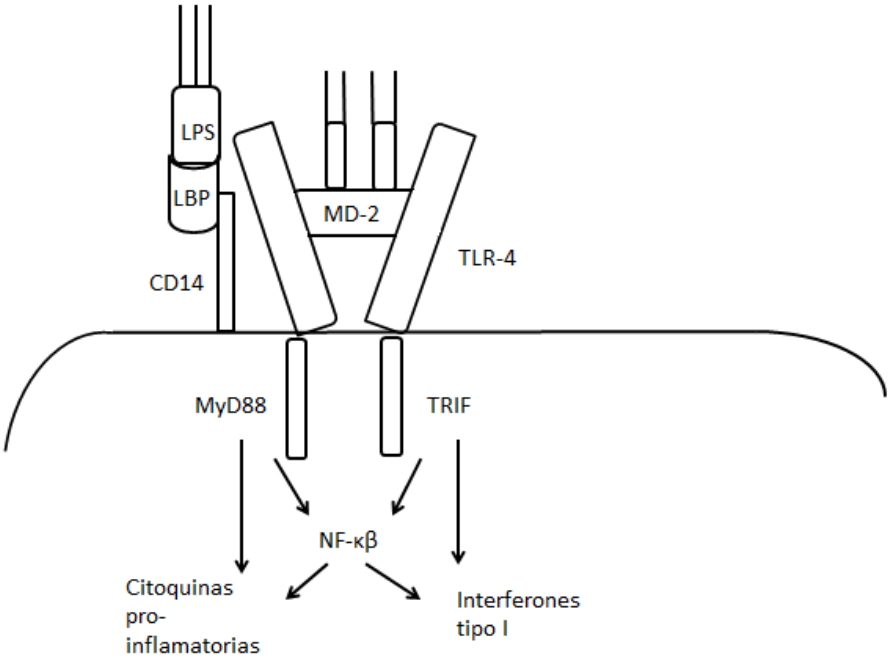

Figura 5. Esquema general del mecanismo de acción del LPS. Fuente: Extraído y modificado de Lu *et al.,* 2008.

2.7 RIA y su efecto sobre la farmacocinética de fármacos.

Por más de 40 años diversos estudios han generado antecedentes que indican que la farmacocinética de los fármacos se ve alterada en presencia de un estado patológico que involucre una infección o inflamación, y que la capacidad del organismo para procesar y metabolizar los fármacos bajo esta condición se ve disminuida (Renton, 2004; Renton, 2005; Aitken *et al.,* 2006; Morgan *et al.,* 2008).

En presencia de una RIA inducida por LPS pueden ocurrir alteraciones a nivel de la absorción, distribución, metabolismo y excreción de fármacos. En cuanto a la absorción, se puede ver afectada por la ocurrencia de diarrea e hipotensión que pueden estar presentes en una RIA. La distribución de fármacos puede alterarse por incremento de los niveles de proteínas plasmáticas como proteínas de fase aguda o disminución de la albúmina. También pueden ocurrir variaciones en la excreción renal de fármacos, debido a la disminución del flujo sanguíneo renal y disminución de la tasa de filtración glomerular, que pueden presentarse en una RIA (Yang y Lee, 2008).

Respecto a las alteraciones en el metabolismo de fármacos, estas ocurren por una alteración en la expresión y actividad de las enzimas del CYP450 que tiene lugar bajo un estado infeccioso o inflamatorio (Renton, 2005; Morgan *et al.,* 2008). Esta regulación a la baja de enzimas metabolizadoras y proteínas transportadoras de fármacos ocurre a nivel de la transcripción génica, donde la actividad de factores de transcripción como NF-κB, causa una regulación a la baja o *downregulation* de la mayoría de los genes P450 (Renton, 2004; Morgan *et al.,* 2008). La regulación de la expresión de genes CYP450 hepáticos en inflamación e infección se ha atribuido a los efectos de las citoquinas proinflamatorias IL-1β, IL-6, TNF-α, e IFNα o γ (Aitken *et al.,* 2006).

En la Figura 6 se muestra como las citoquinas proinflamatorias modulan la función de distintos factores de transcripción nuclear a nivel hepático, que regulan a la baja la expresión de los genes del CYP450 y en consecuencia la actividad de las enzimas que estos codifican. La producción de citoquinas también activa la óxido nítrico sintetasa 2 (NOS2) para que forme óxido nítrico (NO) el cual puede inhibir directamente la actividad enzimática del CYP450 (El-Kadi *et al.,* 2000; Morgan *et al.,* 2008).

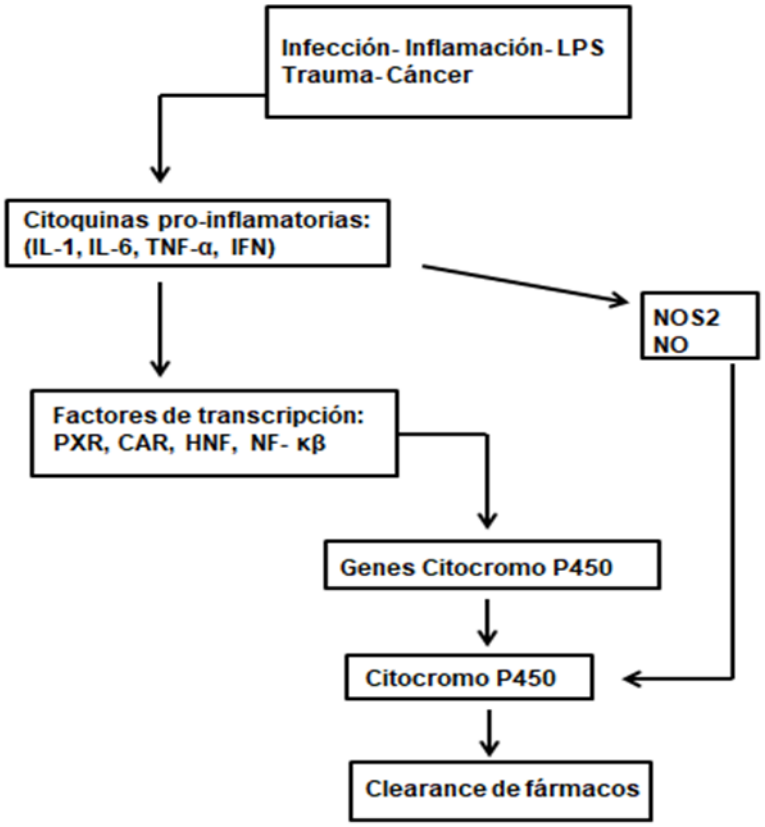

Figura 6. Vías en la reducción del metabolismo de fármacos durante infección e inflamación. Fuente: Extraído y modificado de Morgan *et al.,* 2008.

En consecuencia, a esta regulación a la baja de los genes del CYP450 y la disminución en la actividad y expresión de las enzimas correspondientes, el metabolismo y *clearance* de los fármacos puede verse disminuido lo que traerá como consecuencias una elevación de los niveles plasmáticos y posibles reacciones adversas y de toxicidad. Además, durante el estado inflamatorio el proceso de distribución de los fármacos también puede verse alterado (Kume y Garg, 1986; Renton, 2004; Aitken *et al.,* 2006; Yang y Lee, 2008). Esto es válido para la farmacocinética de FFC, ya que por ser éste

un sustrato de CYP450, en una condición de RIA su metabolismo podría verse disminuido y existir por lo tanto variaciones importantes en las concentraciones plasmáticas de este antibiótico que es preciso considerar al administrar los tratamientos antimicrobianos.

La administración de LPS es el modelo de inflamación que más extensamente se ha estudiado y la reducción en la capacidad de biotransformación de fármacos, en respuesta a un estímulo inflamatorio inducido por LPS ha sido observada tanto en cultivos celulares como en modelos animales (Morgan, 1997; Renton, 2004). En cerdos tratados con cinco dosis repetidas de 17 µg/kg cada 1 h de LPS de *E. coli*, se observa que a las 24 h posteriores se produce una disminución significativa de la actividad de las enzimas del CYP450 y de la cantidad total de CYP450 (Monshouwer *et al.,* 1996). En conejos, Saitoh *et al.* (1999), estudiaron un modelo de RIA inducida por la administración de LPS de *E. coli* en la misma dosis utilizada por Monshouwer *et al.* (1996), y observaron una reducción en el contenido total de CYP y en la actividad enzimática CYP450, disminuyendo así el metabolismo hepático mediado por CYP450.

Considerando lo anterior el LPS ha sido utilizado ampliamente para generar un modelo de RIA en diferentes especies animales como bovinos (Kumar y Malik, 2003), ovinos (Kabaroff *et al*., 2006), conejos (Ladefoged, 1977; Elmas *et al.,* 2006; Elmas *et al.,* 2008), cabras (Kume y Garg, 1986; Rao *et al.,* 2000), cerdos (Post *et al.,* 2003), pollos (De Boever *et al.,* 2010), ratas (Goralski *et al.,* 2003) y ratones (Hu *et al.,* 2013) lo cual ha permitido estudiar su efecto sobre la farmacocinética de diferentes fármacos (Tabla 2). En estos modelos se han evidenciado cambios significativos en la farmacocinética de distintos medicamentos al comparar con animales sanos, los que incluyen cambios en

los procesos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación. En conejos se ha observado que existe un mayor volumen de distribución de trimetoprim en los animales endotoxémicos (Ladefoged, 1977), también ocurre una disminución del *clearance* de enrofloxacino asociado a un aumento del $AUC_{0-\infty}$ en conejos tratados con LPS (Elmas *et al.,* 2006).

Los diferentes resultados indican que los efectos de la respuesta inflamatoria aguda sobre la farmacocinética de los fármacos dependen de factores como las propiedades fisicoquímicas que éstos posean y también de las distintas especies animales donde ocurre la RIA (Kumar y Malik, 2003).

Tabla 2. Modelos de RIA en distintas especies animales para estudio de la farmacocinética de diferentes fármacos.

Especie	**Fármaco**	**Referencia**
Bovinos (terneros)	Oxitetraciclina	Kumar y Malik, 2003
Cabras	Cloranfenicol Enrofloxacino	Kume y Garg, 1986 Rao *et al.,* 2000
Cerdos	Enrofloxacino	Post *et al.,* 2003
Conejos	Trimetoprim Enrofloxacino Flunixin meglumine	Ladefoged, 1977 Elmas *et al.,* 2006 Elmas *et al.,* 2008
Ratas	Digoxina	Goralski *et al.,* 2003

Fuente: Elaboración propia.

3. ROL CITOCROMO P450 EN METABOLISMO DE FÁRMACOS

El complejo enzimático de monooxigenasas del CYP450 cumple un rol fundamental en el metabolismo de fármacos y compuestos endógenos, siendo probablemente el grupo de enzimas más importantes del metabolismo oxidativo en mamíferos y que tiene capacidad para metabolizar múltiples sustratos (Fink-Gremmels, 2008; Liptrott *et al.,* 2009; Maté *et al.,* 2015). Se localiza principalmente a nivel hepático, pero también está presente en diversos tejidos como la mucosa del tracto gastrointestinal, en riñón y pulmón (Ioannides, 2006; Liptrott *et al.,* 2009; Lake y Price 2013). Las principales familias del CYP450 que están involucradas en el metabolismo de fármacos y xenobióticos son CYP1, 2, 3 y 4 (Maté *et al.,* 2015), sin embargo, la subfamilia CYP3A es de particular relevancia para el metabolismo de la mayoría de los fármacos utilizados en humanos y animales (Ioannides, 2006).

3.1 Variaciones del citocromo P450 entre especies

Los antecedentes indican que existen amplias variaciones en el sistema del CYP450 entre las distintas especies animales (Dalvi *et al*., 1987; Nebbia *et al.,* 2003; Toutain *et al.,* 2010). Diversos estudios han investigado las diferencias entre especies animales respecto a la actividad de las enzimas del CYP450, principalmente en cuanto al ser humano y roedores de laboratorio (Boogards *et al.,* 2000); sin embargo, la evidencia respecto de la actividad del CYP450 en especies de interés en medicina veterinaria es mucho más escasa (Fink-Gremmels, 2008). Se considera que en general no es posible establecer relaciones entre características fisiológicas de los animales como ser una especie herbívora o carnívora; o si se trata de un rumiante o monogástrico, con la

actividad del CYP450 por lo que se requiere de análisis individuales para cada especie para tener mayores antecedentes (Fink-Gremmels, 2008).

Se han estudiado las diferencias de actividad del CYP450 en preparados de hígado en distintas especies de producción (Dalvi *et al.,* 1987; Short *et al.,* 1988; Nebbia *et al.,* 2003; Szotáková *et al.,* 2004). En el estudio de Dalvi *et al.* (1987) se observaron diferencias significativas entre ovinos y conejos respecto a la cantidad de CYP450 microsomal y la actividad benzphetamina N-demetilasa, con valores más altos en conejos. Szotáková *et al.* (2004) investigaron la actividad CYP450 en rumiantes como bovinos, cabras y ovejas encontrando diferencias significativas en la mayoría de los CYP450 analizados, con excepción de la actividad hidroxilasa clorzoxazona que fue similar en todas las especies.

Se ha demostrado que el contenido total de CYP450 en conejos es aproximadamente el doble del observado en bovinos y ovejas (Watkins y Klaassen, 1986), siendo también mayor al contenido de CYP450 en ratas, las que a su vez contaron con un 52% más de CYP450 que en cerdos (Watkins y Klaassen, 1986). En cuanto a la presencia de subtipos de CYP, se ha documentado la actividad de la subfamilia CYP3A en conejos y en ovinos (Liu *et al.,* 2011). Nebbia *et al.* (2003) describen un alto contenido de CYP en conejos, que es significativamente mayor en comparación con otras especies como pollos broiler, ratas y bovinos. La actividad desmetilasa sobre sustratos del CYP3A también se observó mayor en conejos que en bovinos (Nebbia *et al.,* 2003). Estos antecedentes explican las diferencias en los promedios de MR% que han sido descritos para el metabolito FFC-a, los que dan cuenta de diferencias en el metabolismo de FFC entre especies, como ha

sido observado entre conejos y rumiantes, donde existen mayores MR% de FFC-a en conejos respecto a ovinos (Park *et al.,* 2007; Palma *et al.,* 2011).

Una de las motivaciones para la medicina veterinaria y salud pública de conocer las diferencias en el metabolismo de fármacos entre especies es poder caracterizar la depleción de residuos farmacológicos en tejidos comestibles (Fink-Gremmels, 2008; Toutain *et al.,* 2010). Estudiar estas diferencias también permite conocer la eficacia y seguridad de los fármacos aplicados en distintas especies animales (Toutain *et al.,* 2010).

4. VARIACIONES FARMACOCINÉTICAS ENTRE ESPECIES

La farmacocinética en los animales puede presentar variaciones de acuerdo con múltiples factores, entre ellos según las distintas especies (Toutain *et al.,* 2010). Estas variaciones se pueden observar en los distintos procesos farmacocinéticos como absorción, distribución, metabolismo y excreción de los fármacos (Lin *et al.,* 1995; Toutain *et al.*, 2010; Jerzsele, 2012).

El origen de las diferencias entre especies en la disposición de los fármacos es diverso y refleja diferencias en los procesos fisiológicos involucrados en el manejo de los fármacos (Toutain *et al.,* 2010). Por ejemplo, pueden existir diferencias entre especies respecto a la fisiología del tracto digestivo, donde lo más notable podría ser las diferencias entre monogástricos y rumiantes, ya que en monogástricos el estómago juega un rol importante en la desintegración y disolución de formulaciones de medicamentos, mientras que en rumiantes la presencia del retículo-rumen tiene una profunda influencia en el destino de los medicamentos debido a su enorme capacidad,

lo que puede afectar la absorción y tiempo medio de residencia de los fármacos administrados vía oral (Toutain *et al.,* 2010; Jerzsele, 2012). También existen diferencias entre las distintas especies respecto al tiempo de tránsito intestinal, superficie de absorción, solubilidad dependiente de pH, las que afectan al proceso de absorción de los fármacos (Lin *et al.,* 1995).

Respecto a la distribución, existen extensas diferencias entre especies respecto al porcentaje de unión a proteínas plasmáticas, lo que condicionará la distribución de los fármacos dentro del organismo, y también su eliminación para los fármacos con bajo *clearance (*Lin *et al.,* 1995). Además, influirán en la distribución las diferencias en composición corporal y contenido graso de las distintas especies (Jerzsele, 2012).

También se ha estudiado que existen diferencias en cuanto al metabolismo y excreción de fármacos entre conejos y rumiantes como bovinos y ovinos, los que se han estudiado a través de la actividad y expresión del CYP450, que fueron mencionadas anteriormente (Dalvi *et al.,* 1987; Nebbia *et al.,* 2003). En general se conoce que las diferencias en la biotransformación de medicamentos entre especies abarcan las reacciones de Fase I y Fase II donde algunas especies presentan dificultad para llevar a cabo ciertas reacciones de conjugación (Lin et al., 1995; Toutain *et al.,* 2010).

Tomando en cuenta lo anterior, es de importancia realizar estudios donde se compare la farmacocinética de los fármacos de interés en medicina veterinaria entre distintas especies animales. Al respecto, se han realizado estudios comparativos sobre la farmacocinética de FFC en camellos, ovejas y cabras, (Ali *et al.,* 2003), y también en pollos, codornices y palomas (Ismail y El-Kattan, 2009). Sin embargo, no existen

antecedentes sobre las variaciones farmacocinéticas de FFC y su metabolito FFC-a entre conejos y ovinos, bajo una condición febril inducida por LPS de *E. coli.*

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades infecciosas causan pérdidas económicas importantes en la producción animal, afectando la salud animal y causando riesgos para la salud pública. Para controlar estas enfermedades es fundamental el uso de agentes antimicrobianos, los que deben tener un uso adecuado para lograr tratamientos efectivos y no poner en riesgo la salud animal ni la de los consumidores, minimizando la probabilidad de contribuir a la resistencia a antibióticos.

Se ha demostrado ampliamente que el comportamiento farmacocinético de los antibióticos y otros fármacos puede verse afectado en los organismos animales por la respuesta inflamatoria aguda que ocurre en presencia de infecciones y otras injurias. Esto puede afectar los distintos procesos farmacocinéticos como absorción, distribución, metabolismo y excreción de fármacos, generando concentraciones inadecuadas del fármaco a nivel plasmático y en el sitio de acción. La exposición a niveles subóptimos del medicamento puede llevar a fallas del tratamiento y desarrollo de resistencia a antibióticos.

Por otra parte, en cuanto al metabolismo farmacológico se sabe que la condición de RIA afecta el metabolismo disminuyendo la expresión del complejo enzimático CYP450 encargado de metabolizar gran parte de los fármacos. Por lo cual los niveles sanguíneos y persistencia de los fármacos pueden aumentar trayendo consigo eventuales complicaciones o reacciones de toxicidad para los animales. Además, es conocido que

la farmacocinética de los fármacos puede sufrir variaciones entre las distintas especies animales. Florfenicol (FFC) es un antibiótico ampliamente utilizado en medicina veterinaria para el tratamiento de infecciones sistémicas en rumiantes y otras especies, y es de interés por lo tanto conocer cómo la RIA puede afectar la farmacocinética de este agente antimicrobiano, ya que en la realidad práctica su administración se realiza bajo una condición infecciosa y febril.

Para responder a esta interrogante en este estudio se investigó cuál es el efecto del estado inflamatorio inducido por el LPS de *E. coli* O128:B12 sobre la farmacocinética de FFC y su principal metabolito (FFC-a) en dos especies animales de interés; ovinos y conejos. El análisis de la farmacocinética de FFC-a permitió conocer acerca de las variaciones en el metabolismo de FFC en presencia de la RIA inducida por el LPS de *E. coli*. Por otro lado, es de interés conocer las variaciones en la farmacocinética de FFC en ambas especies, ya que los ovinos son una especie de interés productivo, donde puede utilizarse FFC para el tratamiento de infecciones, y los conejos son una especie de laboratorio y de interés productivo, que permite comparar los resultados obtenidos en ambas especies, en consideración a las diferencias anatómicas y fisiológicas de cada una de ellas.

Los resultados de este estudio son de utilidad para entregar antecedentes acerca de la necesidad de modificaciones en las dosificaciones de FFC al ser administrado en la especie ovina y conejos en presencia de un estado inflamatorio y febril. Sus resultados pueden tener impacto sobre la salud animal, producción animal y salud pública.

III. HIPÓTESIS

- La respuesta inflamatoria aguda inducida por la administración del lipopolisacárido de *Escherichia coli* en dos especies, conejos y ovinos, aumenta la disposición plasmática y distribución tisular de florfenicol y su metabolito florfenicol amina en comparación con los efectos observados en animales sanos.

IV. OBJETIVOS

1. Objetivo General.

   Determinar el efecto de la respuesta inflamatoria aguda inducida por el lipopolisacárido de *E. coli* sobre la disposición plasmática y distribución tisular de florfenicol y florfenicol amina en conejos y ovinos.

2. Objetivos Específicos.

1. Determinar el efecto de la respuesta inflamatoria aguda inducida por el lipopolisacárido de *E. coli* sobre la disposición plasmática de florfenicol y florfenicol amina, en conejos y ovinos.

2. Determinar el efecto de la respuesta inflamatoria aguda inducida por el lipopolisacárido de *E. coli* sobre la distribución tisular de florfenicol y florfenicol amina, en conejos y ovinos.

3. Comparar la disposición plasmática y distribución tisular de florfenicol y florfenicol amina, entre conejos y ovinos, posterior a la administración de florfenicol en animales sanos.

4. Determinar si existen diferencias de especie en los cambios de disposición plasmática de florfenicol y florfenicol amina inducidos por la administración del lipopolisacárido de *E. coli* en conejos y ovinos.

V. MATERIALES Y MÉTODO

1. Lugar de trabajo.

La fase experimental relacionada con los conejos de este estudio se llevó a cabo en el Bioterio del Laboratorio de Farmacología Veterinaria, y la fase experimental con ovinos se desarrolló en las dependencias del Hospital Clínico Veterinario de animales mayores, ambos pertenecientes al Departamento de Ciencias Clínicas, de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción, Campus Chillán.

El procesamiento y análisis de muestras para la determinación de las concentraciones plasmáticas y tisulares de FFC y FFC-a se desarrolló en el Laboratorio de Farmacología Veterinaria. La realización de los exámenes de hemograma, perfil bioquímico y determinación de concentraciones de marcadores de fase aguda se llevó a cabo en el Laboratorio de Patología Clínica Animal del Departamento de Ciencias Clínicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias.

2. Animales de experimentación.

En el presente estudio se utilizaron dos especies animales: conejos (*Oryctolagus cuniculus*) y ovinos (*Ovis aries*). Se utilizaron conejos adultos de ambos sexos, de la raza

Neozelandés Blanco con peso corporal promedio de 4,3 ± 0,1 kg. Los ovinos utilizados fueron ovejas adultas de raza Suffolk-Down con un peso promedio de 60,5 ± 4,7 kg.

Previo al inicio de los experimentos, se realizó un examen clínico completo a los animales para establecer su condición de clínicamente sanos y aptos para participar de los estudios. El examen clínico incluyó un examen físico con evaluación de constantes fisiológicas y realización de exámenes complementarios que incluyeron hemograma y perfil bioquímico. Los conejos fueron tratados de manera preventiva con fenbendazol (Lombrimic® 10%, Drag Pharma, Chile) para la eliminación de nemátodos en dosis de 20 mg/kg y con toltrazurilo 5% en dosis de 20 mg/kg para la eliminación de coccidias.

Se realizaron exámenes coproparasitarios a los ovinos para determinar su condición parasitológica, por medio del recuento de huevos en materia fecal tanto de nematodos gastrointestinales, como también coccidias y tremátodos. Los animales que resultaron con recuentos positivos a la presencia de huevos de nematodos gastrointestinales fueron tratados con fenbendazol (Panacur® 10%, Intervet, Santiago, Chile), mientras que aquellos que resultaron positivos a la presencia de coccidias fueron tratados con sulfa-trimetoprim (Azovetril®, Veterquímica, Santiago, Chile). Los animales que resultaron positivos a la presencia de Fasciola hepática fueron tratados con triclabenzadole (Soforen® 10%, Novartis, Santiago, Chile).

Aquellos animales que no respondieron a los tratamientos administrados y presentaron recuentos positivos a nematodos gastrointestinales, además de aquellos que presentaron sus parámetros fisiológicos, hematológicos y bioquímicos fuera de los

rangos de normalidad para cada especie se consideraron como no aptos y fueron descartados del estudio.

Los animales que participaron de los experimentos no tuvieron exposición a ningún fármaco por al menos un mes previo al desarrollo de los estudios. Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo con la autorización del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción, según certificado CBE-08-18.

Los conejos se mantuvieron en jaulas individuales de dimensiones 60 x 80 x 40 cm^3, con acceso a salidas diarias a corral de esparcimiento. Se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h. El bioterio cuenta con extractor de aire ambiental con temporizador programado y ventanas al exterior para mantener las condiciones de ventilación. Se dispone de dos ventiladores de pie y calefactor eléctrico para mantener control de la temperatura ambiental, en los meses de verano e invierno, respectivamente. Los conejos recibieron una dieta a base de concentrado peletizado de alfalfa, con un contenido de proteína cruda (PC) de un 17%, fibra cruda (FC) del 16% y extracto etéreo (EE) del 3%. Se les suministró agua fresca *ad-libitum* mediante bebedero automático. Su dieta fue complementada con heno de alfalfa.

Los ovinos se mantuvieron estabulados para reducir el riesgo de infestación parasitaria. Su alimentación fue en base de heno de alfalfa de tercer corte (*Medicago sativa*) y avena en grano (*Avena sativa*), que completan los requerimientos nutricionales de ovinos adultos, junto con acceso a agua *ad-libitum.* Los corrales se encontraron situados bajo techo, protegidos de efectos climáticos adversos y en condiciones de ventilación

apropiadas. La cama se reemplazó en base a las necesidades de mantención de aseo y salud de los animales.

Los modelos animales utilizados en este estudio fueron el conejo y el ovino. El conejo fue elegido por ser especie monogástrica, además de ser animales de fácil manejo y de bajo costo de mantención debido a su pequeño tamaño. Sumado a esto, el conejo como lagomorfo es una especie en la cual se facilita el proceso de extracción de muestras sanguíneas para estudios de farmacocinética donde deben extraerse muestras en tiempos repetidos, en comparación con especies de roedores como ratones donde los procesos de extracción de sangre son más complejos y los volúmenes sanguíneos que pueden extraerse son más pequeños.

El ovino se utilizó debido a que es una especie rumiante de mediano tamaño, lo que hace que su manejo no sea de gran complejidad, y que posee un valor comercial y de mantención inferior a otras especies de rumiantes como el bovino. Además, en ambas especies el antibiótico FFC tiene un claro potencial de ser utilizado y representan especies de interés clínico-productivo, que permiten el estudio farmacocinético y de metabolismo de fármacos.

3. Fármacos y reactivos.

Los estándares puros de FFC (pureza de 99,4%) y FFC-a (pureza de 99,8 %) fueron adquiridos desde Sigma (Saint Louis, MO, USA) y Toronto Research Chemicals (North York, ON, Canadá), respectivamente. Se utilizó una solución inyectable de FFC al 30% para la administración en ovinos (Nuflor®, fabricado por Schering Plough, Santé Animale ZA, La Grindoliere -Segré, France, y distribuido por Intervet Chile). Se utilizó también

una solución de FFC inyectable que se elaboró mediante dilución de Nuflor® 30% en una solución constituida por N- metil pirrolidona, polietilenglicol y propilenglicol (36:21:43 v/v), obteniendo una concentración final de 60 mg/mL, para facilitar la inyección en conejos.

Se utilizó LPS de *E. coli* O128:B12 purificado (Sigma -Aldrich, St Louis, MO, USA). Para los experimentos en conejos se preparó una solución madre con 10 mg de LPS en 10 mL de solución salina estéril (NaCl 0,9%). Luego se preparó una solución intermedia de 20 µg/mL, para lo cual se diluyó 0,2 mL de la solución madre, y finalmente se preparó solución de concentración final de 5 µg/mL diluyendo 5 mL a partir de la solución de 20 µg/mL. En ovinos se preparó una solución madre de LPS de manera similar para obtener una solución de concentración final de 20 µg/mL, necesaria para administrar una dosis de 1 mL/20 kg.

Para los procedimientos de eutanasia, en conejos se utilizó xilacina (Xilazina® 2%, Centrovet, Santiago de Chile) y ketamina (Ketamil® 100 mg/mL, Agrovet, Santiago de Chile). Para realizar la eutanasia en ovinos se utilizó xilacina (Xylavet® 2%, Agroland, Santiago de Chile) y solución de eutanasia (T-61®, Intervet Chile, Santiago de Chile). También se administró solución sobresaturada de sulfato de magnesio al 50% (Coexport Chile Ltda ®, San Bernardo, Chile).

Todos los solventes utilizados para la extracción y análisis cromatográficos fueron grado HPLC (Merck, Darmstadt, Alemania).

4. Diseño experimental.

Experimento 1. Efecto de la administración del LPS de *E. coli* sobre los parámetros de hemograma, perfil bioquímico y marcadores inflamatorios IL-6 y PCR en conejos.

Experimento 1. Previo a la realización de experimento para determinar el efecto del LPS de *E. coli* sobre la disposición plasmática de FFC y FFC-a, que da respuesta al Objetivo 1 del estudio, se realizaron experimentos para evaluar y confirmar el establecimiento de la RIA inducida por la administración de LPS de *E. coli* en conejos. Previo y posterior a la administración de LPS en los animales experimentales se registró la temperatura corporal mediante termómetro clínico digital. Además, se extrajeron muestras sanguíneas desde la vena auricular para realización de hemograma y perfil bioquímico, y para medición de concentraciones de IL-6 y PCR, con el fin de evaluar las variaciones de estos parámetros como indicadores de RIA inducida por LPS.

Se trabajó con diez conejos los que se distribuyeron en pares de animales similares en edad, sexo y peso corporal mediante un diseño de bloques al azar en dos grupos de cinco animales. Al grupo I (tratado) se le administraron tres dosis IV de 2 µg/kg de LPS de *E. coli* O128:B12 en la vena marginal de la oreja a las 0 h, 6 h y 23 h 15 minutos (23,25 h) desde el inicio del experimento, con la finalidad de reproducir en los animales una RIA similar a la que ocurriría en condiciones naturales de una infección. Por otra parte, el grupo II (control) fue tratado con un volumen equivalente de solución de cloruro de sodio al 0,9% (SS) vía IV a igual volumen, frecuencia y tiempo de inyección que el grupo tratado. La aplicación de LPS y la obtención de muestras sanguíneas se realizaron según los tiempos indicados en la Figura 7.

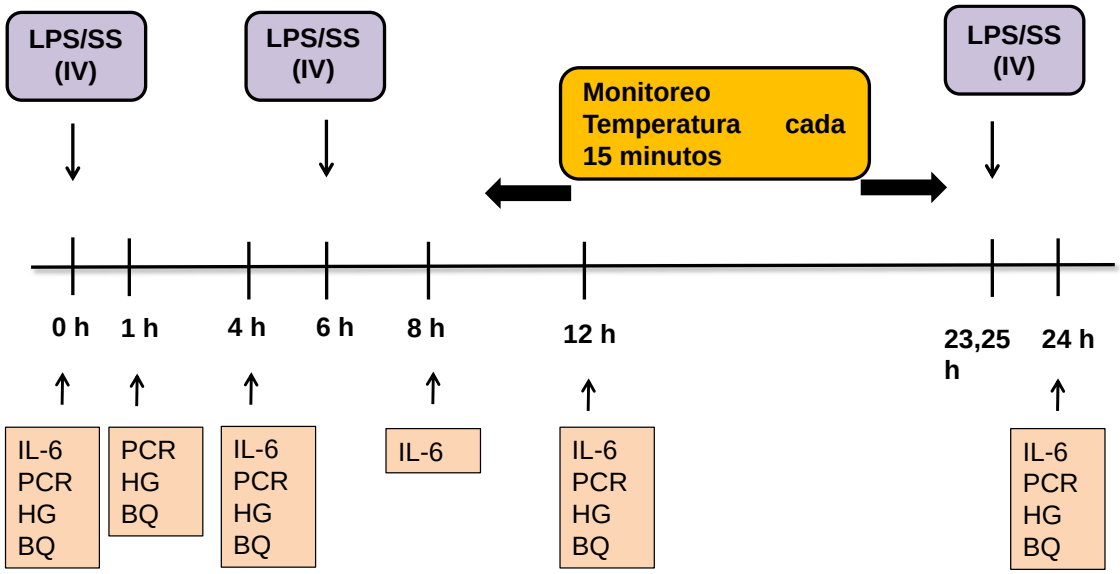

Figura 7. Esquema de extracción de muestras sanguíneas en conejos, correspondiente a experimento 1. HG: Hemograma; PB: Perfil bioquímico; IL-6: Interleuquina-6; PCR: Proteína C reactiva. Fuente: Elaboración propia.

Objetivo 1A. Determinar el efecto de la respuesta inflamatoria aguda inducida por el lipopolisacárido de *E. coli* sobre la disposición plasmática de florfenicol y florfenicol amina en conejos.

Experimento 2. Efecto de la administración del LPS de *E. coli* sobre la disposición plasmática de FFC y FFC-a en conejos, posterior a la administración IV de FFC.

Experimento 2. Para este experimento se utilizaron doce conejos que se asignaron a dos grupos de seis animales cada uno, distribuidos en pares de animales según sexo y peso corporal, ya sea al grupo tratado con LPS o al grupo control que recibió SS. El grupo tratado con LPS recibió tres dosis IV de la endotoxina de 1 µg/kg a las 24 h, 16 h y 0,75 h previo a la administración de FFC. El grupo control recibió SS en los mismos

volúmenes y frecuencia de administración que el grupo tratado con LPS. A las 24 h posterior a la primera inyección de LPS o SS ambos grupos fueron tratados con FFC vía IV en una dosis de 20 mg/kg. Se extrajeron muestras de sangre (2 mL) por punción directa de la vena marginal de la oreja, previo (muestra basal o T0) y posterior a la administración de FFC en los siguientes tiempos: 0,03 (T1), 0,5 (T2), 1 (T3), 2 (T4), 4 (T5), 8 (T6), 12 (T7) y 24 h (T8) (Figura 8).

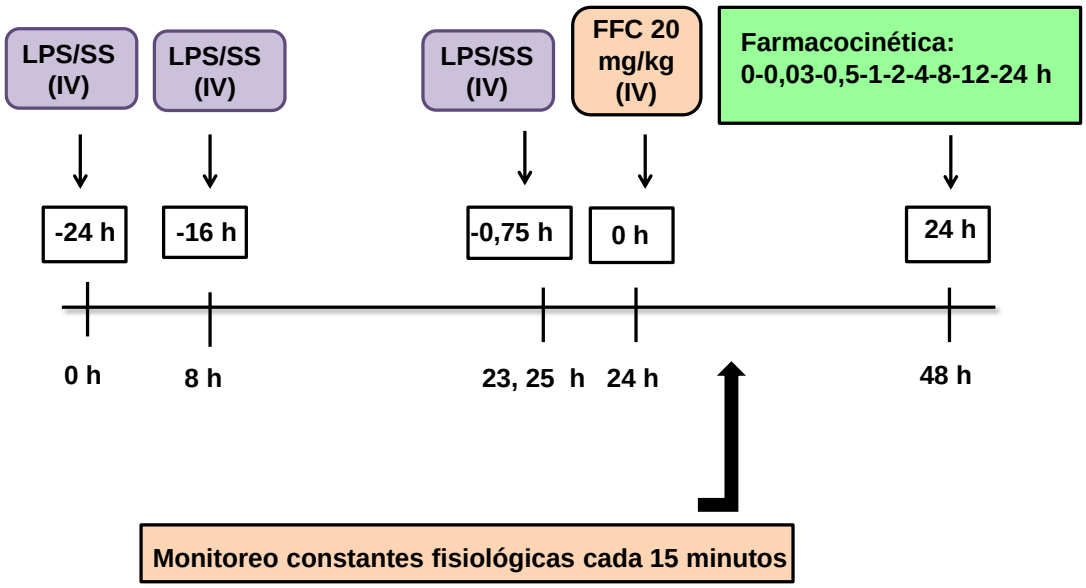

Figura 8. Esquema de extracción de muestras sanguíneas en conejos previo y posterior a la administración de florfenicol vía intravenoso, correspondiente a Experimento 2. Fuente: Elaboración propia.

Experimento 3. Efecto de la administración del LPS de *E. coli* sobre la disposición plasmática de FFC y FFC-a en conejos, posterior a la administración IM de FFC.

Experimento 3. Pares de diez conejos similares en edad, sexo y peso corporal fueron distribuidos mediante un diseño de bloques al azar en dos grupos de cinco animales. Al grupo I (tratado) se le administraron tres dosis vía IV de 2 µg/kg de LPS de *E. coli* O128:B12 en la vena marginal de la oreja a las 0 h, 6 h y 23 h 15 minutos (23,25 h) desde el inicio del experimento. Por otra parte, al grupo II (control) se le administró un volumen equivalente de solución de cloruro de sodio al 0,9% (SS) vía IV a igual frecuencia y tiempo de inyección que el grupo tratado. A las 24 h posterior a la primera inyección de LPS o SS ambos grupos fueron tratados con FFC vía IM en una dosis de 20 mg/kg, administrada en el miembro posterior izquierdo. Se extrajeron muestras de sangre (2 mL) por punción directa de la vena marginal de la oreja, previo (muestra basal o T0) y posterior a la administración de FFC en los siguientes tiempos: 0,5 (T1), 0,75 (T2), 1 (T3), 1,5 (T4), 2 (T5), 4 (T6), 6 (T7), 8 (T8) y 12 (T9) h (Figura 9).

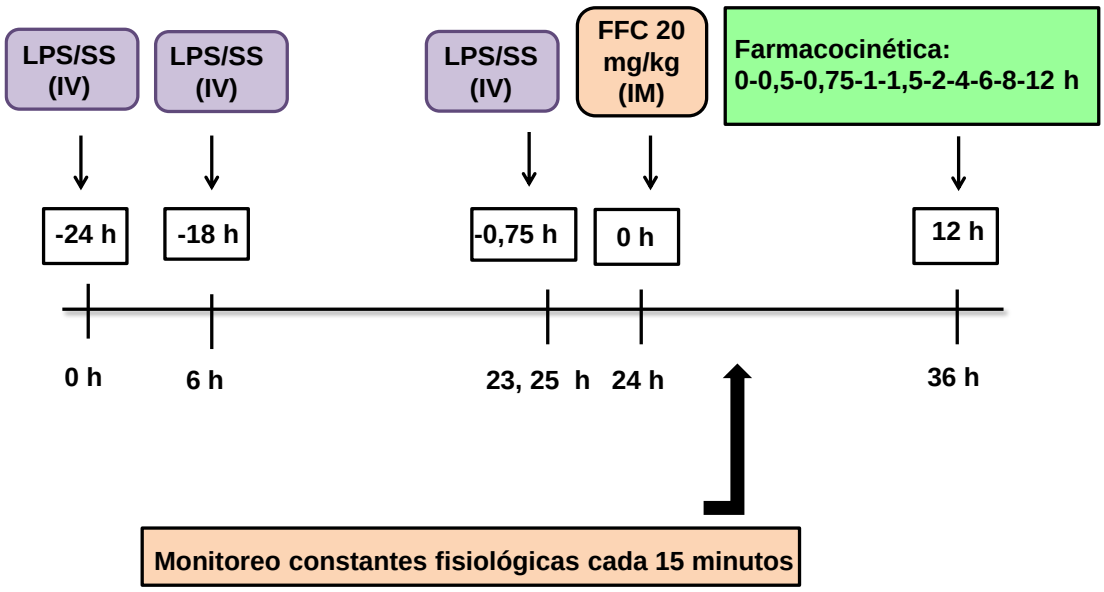

Figura 9. Esquema de extracción de muestras sanguíneas en conejos previo y posterior a la administración de florfenicol vía intramuscular, correspondiente a Experimento 3. Fuente: Elaboración propia.

Objetivo 2A. Determinar el efecto de la respuesta inflamatoria aguda inducida por el lipopolisacárido de *E. coli* sobre la distribución tisular de florfenicol y florfenicol amina en conejos.

Experimento 4. Efecto de la administración del LPS de *E. coli* sobre la distribución tisular de FFC y FFC-a en conejos, posterior a la administración IM de FFC.

Experimento 4. Diez conejos se distribuyeron en pares de animales similares en edad, sexo y peso corporal y fueron distribuidos en 2 grupos de 5 animales: Grupo 1 tratado con LPS y Grupo 2 (control) tratado con solución salina. Veinticuatro horas después de la primera inyección de LPS o SS, a ambos grupos de animales se les administró una dosis de 20 mg/kg de FFC vía IM en el miembro posterior izquierdo. Luego de un período

de 4 h después de la administración de FFC se realizó eutanasia a los animales, y posteriormente se colectaron muestras de tejidos desde los órganos: riñón, hígado, pulmón, bazo, músculo y cerebro para analizar las concentraciones tisulares de FFC y FFC-a (Figura 10). Los órganos fueron mantenidos en refrigeración a 4°C y luego fueron homogenizados y almacenados en congelación a -18 °C hasta el momento de su análisis.

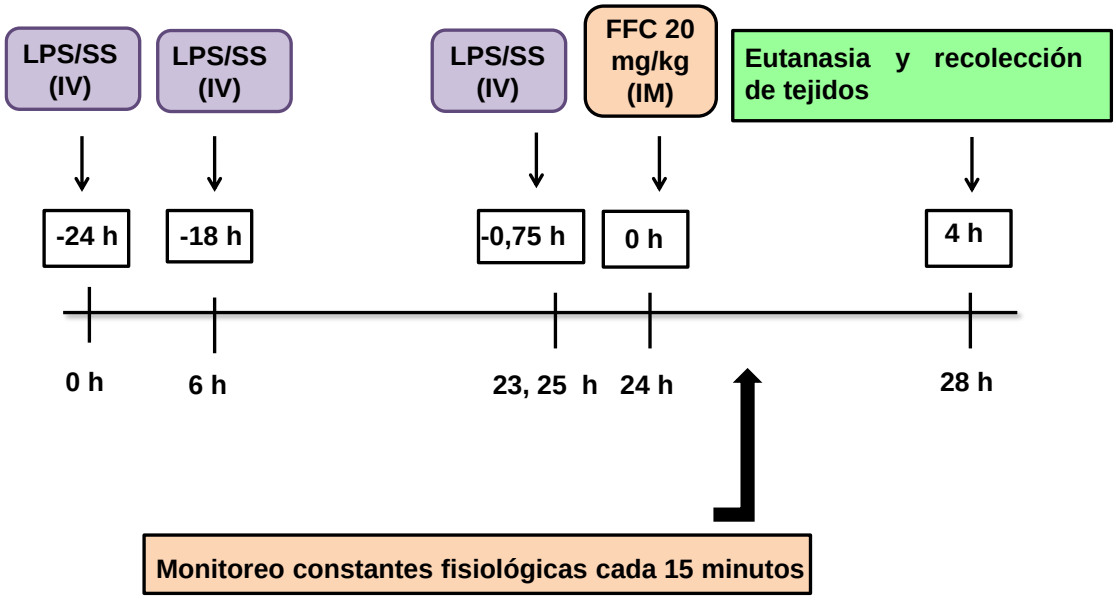

Figura 10. Esquema de extracción de muestras tisulares en conejos control o tratados con LPS previo y posterior a la administración de florfenicol vía IM, correspondiente a experimento 4. Fuente: Elaboración propia.

Experimento 5. Efecto de la administración del LPS de *E. coli* sobre los parámetros de hemograma, perfil bioquímico y marcadores inflamatorios IL-6 y PCR en ovinos.

Experimento 5. Se trabajó con diez ovinos, que fueron distribuidos en dos grupos de cinco animales mediante un diseño de bloques al azar considerando las variables edad

y peso corporal. El grupo I (LPS) fue tratado con tres dosis vía IV de LPS de *E. coli* O128:B12 de 1 µg/kg, disuelto en solución salina (NaCl 0,9%), a las 0 h, 8 h, y 23 h 15 minutos (23,25 h), con la finalidad de reproducir en los animales la RIA. Al grupo II (control) se le administraron tres inyecciones vía IV de suero salino (SS); NaCl al 0,9% en los mismos volúmenes y frecuencia que el grupo tratado. Se realizó monitoreo de temperatura cada 15 minutos durante el transcurso del experimento. Se extrajeron muestras sanguíneas para realización de hemograma y perfil bioquímico, y para medición de concentraciones de IL-6 y PCR. En la Figura 11 se muestra el esquema experimental utilizado para evaluar los efectos de la RIA sobre los parámetros hematológicos, bioquímicos y concentraciones de IL-6 y PCR de los ovinos control y tratados con LPS de *E. coli*.

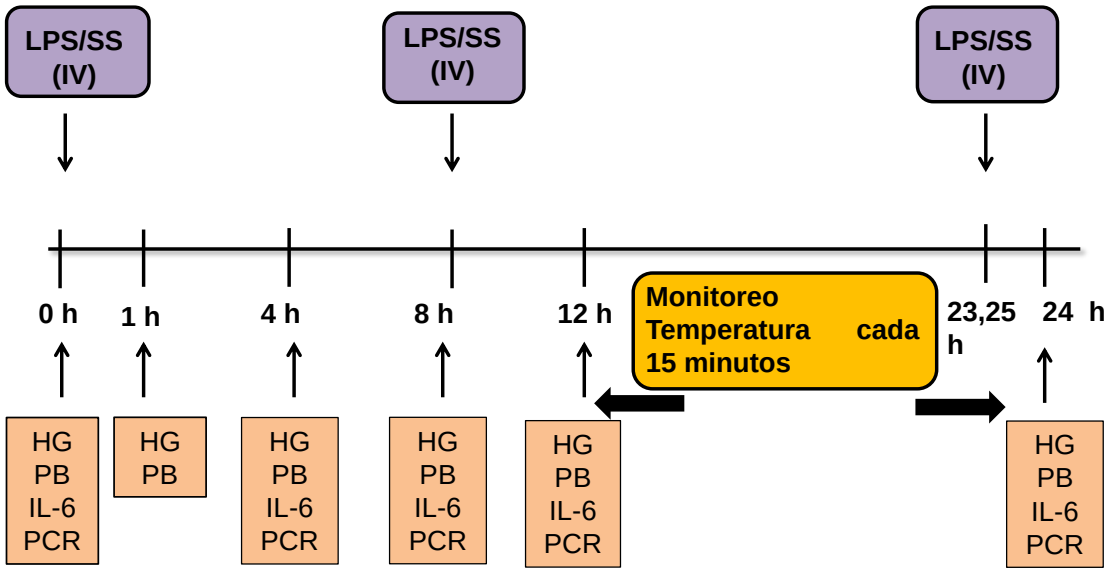

Figura 11. Esquema de extracción de muestras sanguíneas en ovinos control o tratados con LPS, correspondiente a experimento 5. HG: Hemograma; PB: Perfil bioquímico; IL-6: Interleuquina-6; PCR: Proteína C reactiva; LPS: Lipopolisacárido de *E. coli*; SS: Suero salino. Fuente: Elaboración propia.

Objetivo 1B. Determinar el efecto de la respuesta inflamatoria aguda inducida por el lipopolisacárido de *E. coli* sobre la disposición plasmática de florfenicol y florfenicol amina, en ovinos.

Experimento 6. Efecto de la administración del LPS de *E. coli* sobre la disposición plasmática de FFC y FFC-a en ovinos, posterior a la administración IV de FFC.

Experimento 6. Para este experimento se utilizaron doce ovinos que se asignaron a dos grupos de seis animales cada uno; se distribuyeron en pares de animales similares en peso corporal, en el grupo tratado con LPS o grupo control que recibió SS. El grupo I (LPS) fue tratado con tres dosis IV de LPS de *E. coli* de 1 µg/kg, administradas en la vena yugular, a las 24 h, 16 h y 0,75 h previo a la administración de FFC. Por su parte el grupo control recibió SS en los mismos volúmenes y frecuencia que el grupo tratado con LPS. En ambos grupos se administró FFC (Nuflor® 30%) en dosis única IV de 20 mg/kg, 24 h posterior a la primera inyección de LPS o SS. Las muestras de sangre (5 mL) fueron obtenidas por punción directa de la vena yugular, previo (muestra basal o T0) y en los siguientes tiempos: 0,05 (T1), 0,25 (T2), 0,5 (T3), 1 (T4), 2 (T5), 4 (T6), 6 (T7), 8 (T8), 10 (T9), 12 (T10) y 24 (T11) h, posterior a la administración de FFC (Figura 12).

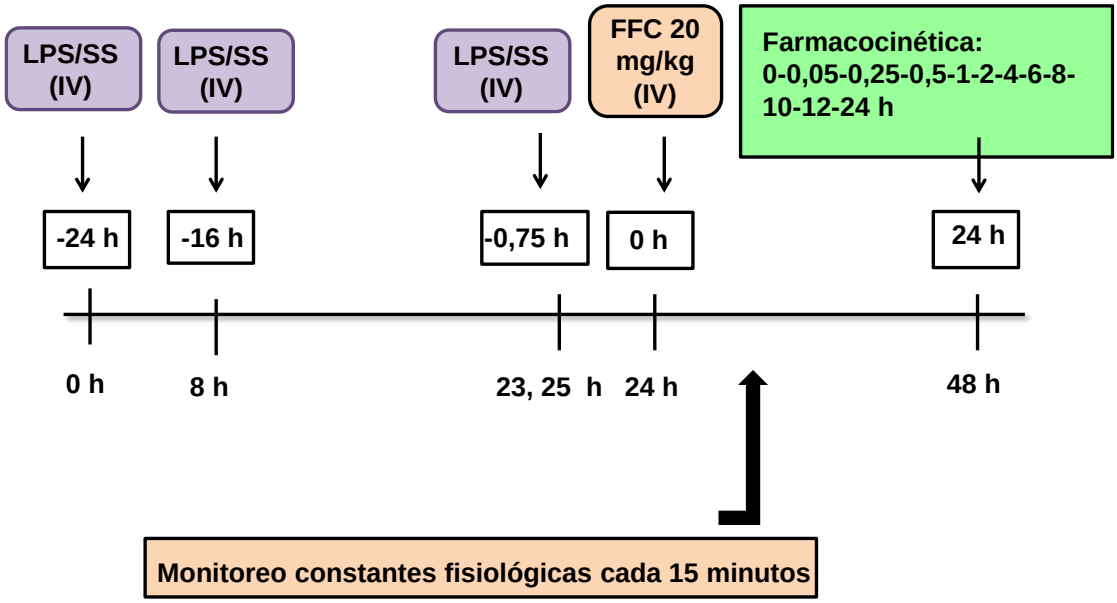

Figura 12. Esquema de extracción de muestras sanguíneas en ovinos controles o tratados con LPS posterior a la administración de florfenicol vía intravenoso, correspondiente a Experimento 6. Fuente: Elaboración propia.

Experimento 7. Efecto de la administración del LPS de *E. coli* sobre la disposición plasmática de FFC y FFC-a en ovinos, posterior a la administración IM de FFC.

Experimento 7. Se utilizaron diez ovinos de raza Suffolk Down los que se distribuyeron en pares de animales similares en edad y peso corporal mediante un diseño de bloques al azar en dos grupos experimentales: el grupo I fue tratado con tres dosis vía IV de LPS de *E. coli* de 1 µg/kg, a las 0 h, 8 h y 23 h 15 minutos (23,25 h) de iniciado el experimento. Al grupo II o control se le administró igual volumen de solución salina (NaCl al 0,9%: SS). Veinticuatro horas después de la primera inyección de LPS o SS en ambos grupos de ovinos se administró una dosis de 20 mg/kg de FFC vía IM en en el miembro posterior izquierdo. Se colectaron muestras de sangre (5 mL) desde la vena yugular previo

(muestra basal o T0) a la administración de FFC y a las 0,05 (T1), 0,25 (T2), 0,5 (T3) 1 (T4), 2 (T5), 3 (T6) y 4 (T7) h posteriores al tratamiento con FFC (Figura 13).

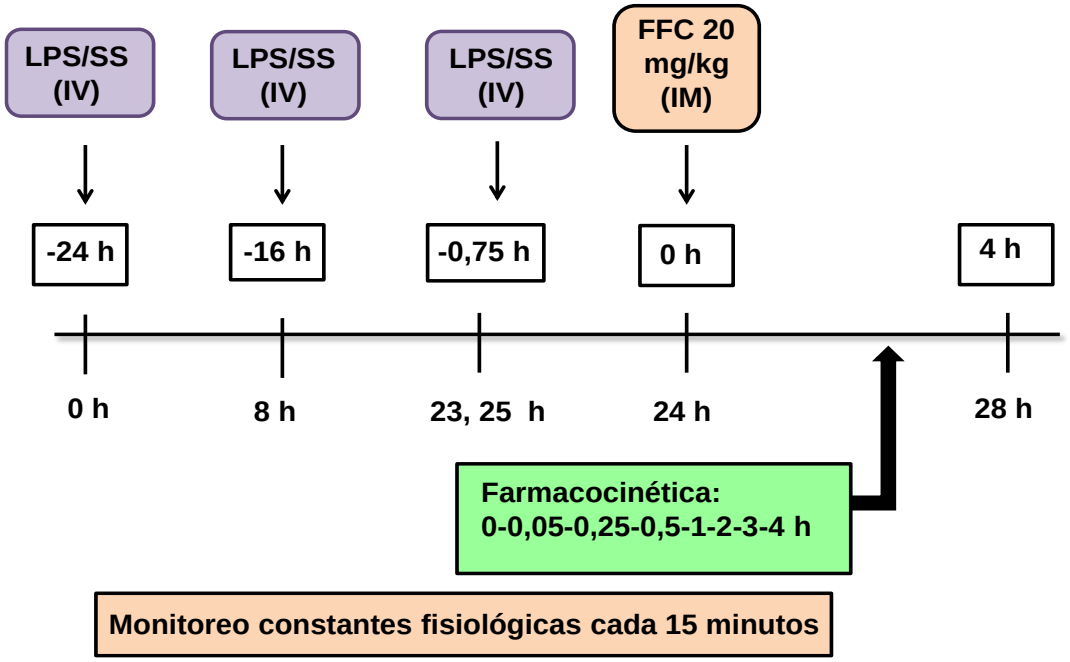

Figura 13. Esquema de extracción de muestras sanguíneas en ovinos posterior a la administración de florfenicol vía intramuscular, correspondiente a experimento 7. Fuente: Elaboración propia.

Objetivo 2B. Determinar el efecto de la respuesta inflamatoria aguda inducida por el lipopolisacárido de *E. coli* sobre la distribución tisular de florfenicol y florfenicol amina en ovinos.

Experimento 8. Efecto de la administración del LPS de *E. coli* sobre la distribución tisular de FFC y FFC-a en ovinos, posterior a la administración IM de FFC.

Experimento 8. Se trabajó con diez ovinos de raza Suffolk Down que fueron distribuidos en dos grupos de cinco animales cada uno, mediante un diseño de bloques al azar considerando edad y peso corporal: el grupo I fue tratado con tres dosis de 1 µg/kg LPS de *E. coli* vía IV (a las 0 h, 8 h y 23, 25 h de iniciado el experimento). El grupo II o control fue tratado con solución salina (NaCl al 0,9%: SS) a igual volumen y frecuencia de administración. Veinticuatro horas después de la primera inyección de LPS o SS, en ambos grupos de ovinos se administró una dosis de 20 mg/kg de FFC vía IM en el miembro posterior izquierdo. A las 4 h posteriores a la administración de FFC, los ovinos fueron sometidos a eutanasia mediante protocolo que se describe más adelante. Luego se realizó la recolección de muestras de tejidos: hígado, riñón, músculo, cerebro, bazo y pulmón. Las muestras se mantuvieron almacenadas en frío a 4°C hasta el momento de ser homogenizadas para luego ser almacenadas en congelación a -18 °C hasta el análisis de las concentraciones tisulares de FFC y FFC-a (Figura 14).

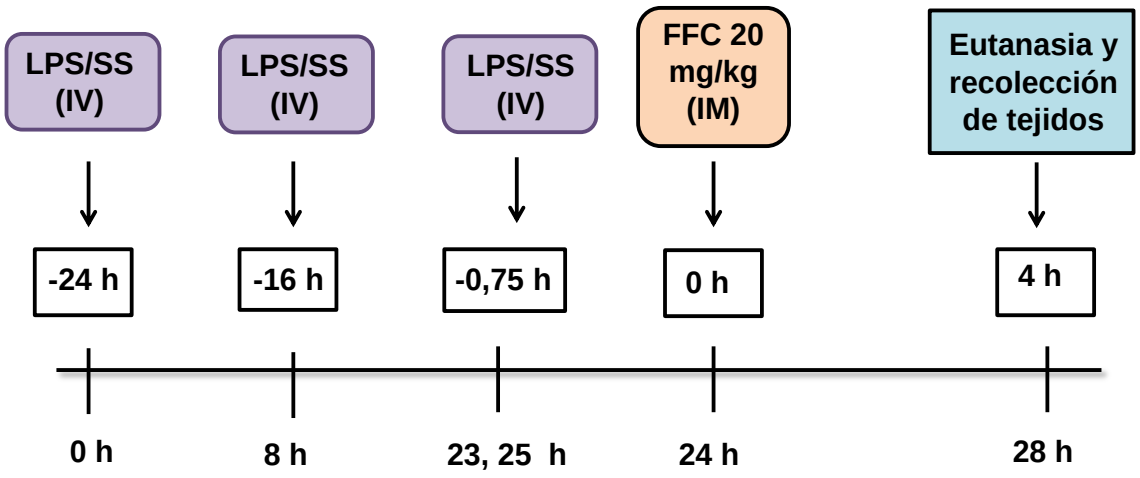

Figura 14. Esquema de extracción de muestras tisulares en ovinos posterior a la administración de FFC vía IM, correspondiente a experimento 8. Fuente: Elaboración propia.

Objetivo 3. Comparar la disposición plasmática y distribución tisular de florfenicol y florfenicol amina, entre conejos y ovinos, posterior a la administración de florfenicol en animales sanos.

Para llevar a cabo el objetivo 3 y determinar diferencias de especie, se compararon las concentraciones plasmáticas y parámetros farmacocinéticos obtenidos para FFC y su metabolito FFC-a en animales control, considerando resultados obtenidos posterior a la administración IV de FFC, entre ambas especies. También se compararon las concentraciones tisulares de FFC y FFC-a de animales control, obtenidos posterior a la administración IM de FFC, entre conejos y ovinos.

La comparación se realizó mediante prueba estadística Análisis de Varianza (ANOVA) con test de Tukey para comparaciones múltiples, para el análisis de concentraciones plasmáticas y mediante prueba T de Student para las comparaciones entre dos grupos de parámetros farmacocinéticos y concentraciones tisulares. En el caso que los datos no siguieran una distribución normal se compararon mediante prueba de Kruskall Wallis o Mann Whitney, según correspondiera, considerando valor de significancia estadística de $p \leq 0,05$.

Objetivo 4. Determinar si existen diferencias de especie en los cambios de disposición plasmática de florfenicol y florfenicol amina inducidos por la administración del lipopolisacárido de *E. coli,* en conejos y ovinos.

Para evaluar diferencias entre ambas especies en estudio respecto a los cambios inducidos por la RIA sobre la farmacocinética de FFC y FFC-a, se calculó para cada

animal el porcentaje de cambio de los parámetros farmacocinéticos entre el valor del grupo tratado con LPS respecto del valor del grupo control, según la siguiente fórmula:

Porcentaje de cambio (Δ%) = ((Valor LPS – Valor Control) /Valor Control) x100

Este valor de delta se obtuvo para ovinos y conejos, y posteriormente se compararon estos resultados mediante prueba estadística de T student o Mann Whitney según correspondiera de acuerdo con el tipo de distribución de los datos, para determinar diferencias entre ambas especies.

5. Condiciones Experimentales.

Tamaño de muestra y análisis estadístico.

El número de animales a utilizar en el estudio se determinó según la siguiente fórmula de acuerdo con Eng (2003):

$$N = \frac{4\,\sigma^2\,(z\ crit + z\ pwr)^2}{D^2}$$

Dónde:

N= Es el tamaño total de la muestra (la suma de todos los grupos experimentales).

σ= Es la desviación estándar (D.E.) asumida de cada grupo. Se utilizó la D.E. de $AUC_{0\text{-}t}$ descrita anteriormente para FFC obtenida para ovinos según Palma *et al*. (2011), y en conejos se utilizó la D.E. de $AUC_{0\text{-}t}$ descrita anteriormente para FFC obtenida en conejos según Koc *et al*. (2009).

Zcrit= Es el valor crítico de tabla para el criterio de significancia deseada.

Zpwr= Es el valor de tabla para la potencia estadística deseada.

D= Es la mínima diferencia esperada entre dos medias.

Para el cálculo del tamaño muestral se utilizó una significancia de 0,05 y un poder de prueba de 0,8.

Registro de las constantes fisiológicas.

Se registró la temperatura rectal (°C) de los animales mediante termómetro digital, realizando mediciones cada 15 minutos durante el transcurso de la etapa experimental. En los ovinos, se registró la temperatura de 2 animales; animal control y animal tratado con LPS, los que fueron mantenidos en bretes individuales que se monitorearon en paralelo. Se consideró como indicador de fiebre un aumento de 0,7 °C por sobre la temperatura rectal basal. Además, se midió la temperatura ambiental de los lugares de mantención de conejos y ovinos mediante un termómetro de mínima y máxima.

Recolección de muestras para hematología y bioquímica sanguínea.

Para la recolección de muestras sanguíneas en los conejos se extrajo 1 mL de sangre mediante punción en la vena marginal de la oreja bajo anestesia tópica con benzocaína (Doldent® gel), utilizando una jeringa de 1 mL y aguja 25G. La sangre colectada se distribuyó en un tubo MiniCollect® con EDTA (0,3 mL) para el análisis de hemograma y en un tubo MiniCollect® sin anticoagulante (0,6 mL) para perfil bioquímico.

En los ovinos para la recolección de muestras para análisis de hemograma y perfil bioquímico se extrajeron 4 mL de sangre desde la vena yugular utilizando una jeringa de 5 mL con aguja de 21G. La sangre se colectó en tubo vacutainer® con EDTA (1 mL), y en un tubo vacutainer® sin anticoagulante (3 mL) para la realización de hemograma el primero y perfil bioquímico el segundo.

Para análisis de concentraciones de IL-6 y PCR se colectaron, además, volúmenes de sangre de 2 mL en ovinos y de 1 mL en conejos en tubo sin anticoagulante. Posteriormente las muestras para análisis de IL-6 y PCR fueron centrifugadas a 1370 *g* por 10 minutos (centrífuga Labofuge 200 Heraeus Sepatech) y se almacenaron a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

Recolección de muestras para análisis concentraciones plasmáticas de FFC y FFC-a.

Para los experimentos en conejos la sangre colectada se distribuyó en dos tubos MiniCollect® con anticoagulante EDTA (2 mL), y las muestras fueron centrifugadas a 1370 *g* por 10 minutos en centrífuga Labofuge 200 Heraeus sepatech.

En los experimentos con ovinos las muestras de sangre fueron colectadas en tubos al vacío con EDTA (BD Vacutainer®, Santiago, Chile) (4 mL) y centrifugadas (centrífuga refrigerada Centra CL3R Thermo IEC) a 2000 *g* por 10 minutos a 4°C. En los experimentos en conejos y en ovinos el plasma obtenido se almacenó a -20 °C hasta el momento de su análisis.

Procedimientos de eutanasia y recolección de muestras de tejidos para análisis concentraciones FFC y FFC-a.

La eutanasia de los conejos se realizó aplicando el siguiente protocolo: se administró asociación de xilacina y ketamina vía IV en la vena marginal de la oreja, utilizando dosis de xilacina de 5 mg/kg (Xilazina® 2%, Centrovet, Santiago de Chile) y ketamina en dosis de 35 mg/kg (Ketamil® 100 mg/mL, Agrovet, Santiago de Chile). La eutanasia en los ovinos se realizó mediante la aplicación del siguiente protocolo: se indujo sedación mediante la inyección IV de 0,5 mg/kg de xilacina (Xylavet® 2%, Agroland, Santiago de Chile) en la vena yugular. Una vez comprobado el efecto sedante se procedió a la inyección de solución para eutanasia T61® (Intervet Chile, Santiago de Chile) en volumen de 5 a 6 mL por animal. Luego se aplicó una solución sobresaturada de sulfato de magnesio al 50% (Coexport Chile Ltda ®, San Bernardo, Chile) vía IV en la vena yugular en dosis de 6 g/kg. Los protocolos de eutanasia se aplicaron en conformidad a las recomendaciones de la *American Veterinary Medical Association (AVMA) Guidelines for the Euthanasia of Animals* (Leary, 2013). Inmediatamente después de finalizar el proceso de eutanasia, cada animal fue desangrado mediante la sección de ambas venas yugulares y arterias carótidas y suspendido por sus miembros posteriores por un período de 5 minutos. Luego, se procedió a la recolección de muestras de tejidos tales como: hígado, riñón, músculo (semitendinoso- semimembranoso, *Longissimus dorsi* y diafragma), pulmón, bazo y cerebro. Estos procedimientos se realizaron en el pabellón de necropsia del Departamento de Patología y Medicina Preventiva de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción, Campus Chillán.

Los tejidos colectados fueron homogenizados y almacenados en congelación (-20°C) en el laboratorio de Farmacología hasta su análisis.

6. Procedimientos Analíticos.

Determinación de los parámetros hematológicos y bioquímicos.

Análisis del hemograma.

Para la determinación del volumen globular (%) se utilizaron tubos de microhematocrito que fueron centrifugados a 14500 *g* por 4 minutos (centrifuga Hematocrit centrifuge, KHT-410 E). El volumen globular, hemoglobina, recuento de leucocitos (leucocitos/µL) y plaquetas se determinaron mediante uso de contador hematológico (HumaCount 30^{TS} ®, Human GmbH, Wiesbaden, Alemania).

Análisis del perfil bioquímico.

Las muestras se centrifugaron a 2000 *g* (centrífuga Megafuge 1. OR Heraeus). Para realizar los análisis de bioquímica sanguínea se utilizó el equipo analizador bioquímico automático DiruiCs600 (Changchun, Jilin, P.R. China) y los reactivos Dyasis (Diasys Diagnostic Systems GmBH, Holzheim, Deutshland). Para determinar la actividad enzimática (Unidades por litro: U/L) de las enzimas aspartato aminotransferasa (AST), gamma glutamil transpeptidasa (GGT), alanina aminotransferasa (ALT) y fosfatasa alcalina (FA) se utilizaron reactivos comerciales del laboratorio Diasys®, de acuerdo con el método cinético-fotométrico estandarizado por la International Federation of Clinical Chemistry (IFCC).

Las concentraciones de proteínas totales (g/L) y albúmina (g/L) se determinaron mediante la aplicación de reactivos comerciales (Laboratorio Diasys®, Alemania), a través de métodos fotométricos de punto final. Las proteínas totales se determinaron mediante método fotométrico de Biuret y la albúmina mediante uso del verde bromocresol. La concentración de globulinas (g/L) se determinó por medio de la diferencia entre el valor de proteína total y el valor de albúmina sérica.

La creatinina se determinó mediante test cinético fotométrico según método de Jaffé. La urea se evaluó mediante método UV enzimático de la ureasa, y la bilirrubina mediante método cinético fotométrico.

El calcio se analizó mediante método fosfonazo, mientras que el fósforo se determinó a través de método Molibdato UV. La glucosa se midió mediante método GOD-PAP.

Determinación de concentraciones de interleuquina-6 (IL-6) y proteína C reactiva (PCR) mediante ELISA.

Las concentraciones de IL-6 se determinaron en conejos y ovinos mediante la técnica ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), tipo sándwich. En conejos se utilizó kit comercial *Rabbit Interleukin* 6 CUSABIO®. En ovinos se utilizó kit comercial *Sheep Interleukin* 6 CUSABIO®. Las muestras se procesaron de acuerdo con las instrucciones de cada Kit específico. Las muestras de plasma se descongelaron a temperatura ambiente y se diluyeron en proporción 1:400 en diluyente de ensayo. Se elaboró curva estándar y se agregó volumen de 100 µL de cada muestra experimental a los pocillos de la placa recubiertos previamente con anticuerpo anti-conejo, o anti-oveja, según fuera el caso. Se incubó la placa por 2 horas a 37°C, posteriormente se eliminó el líquido de los

pocillos y se agregó anticuerpo de detección biotinilado. Se realizó nueva incubación por una hora a 37°C. Luego se lavó la placa con solución Buffer y se agregaron 100 µL del conjugado de avidina con peroxidasa de rábano (*Horseradish peroxidase: HRP*). Se incubó por 1 hora a 37°C y se lavó la placa nuevamente. Se agregó el sustrato cromógeno tetrametilbenzidina (TMB), el cual posterior a incubación genera reacción colorimétrica al producirse unión de IL-6 con avidina conjugada a la enzima y al anticuerpo biotinilado. Finalmente se añadió la solución de detención de la reacción que contiene ácido sulfúrico y se leyó la placa a una longitud de onda de 540 nm, en lector Multiskan Go ThermoScientific®.

Las concentraciones de la PCR se determinaron en conejos y ovinos mediante la técnica de ELISA tipo sándwich. Las muestras de suero se procesaron de acuerdo con las instrucciones de Kit comercial para detección de PCR en conejos (*Oryctolagus cuniculus* Cloud -Clone®, Corp.), y kit específico para ovinos (*Ovis aries,* Cloud -Clone®, Corp.), La lectura se realizó en espectrofotómetro y las muestras se procesaron de acuerdo con instrucciones de cada kit específico. Se descongelaron las muestras a temperatura ambiente y se diluyeron con un diluyente de ensayo proporcionado con el kit en proporción 1:500. Se preparó una curva estándar proporcionada por el kit y se agregó un volumen de 100 µL de cada punto estándar y de cada muestra experimental a los pocillos de la placa previamente recubierta con anticuerpo específico de PCR de conejo o de ovino según corresponda. Luego se incubó por una hora a 37°C, posteriormente se removió el líquido de los pocillos y se agregó anticuerpo de detección biotinilado para incubar por una hora a 37°C. Se realizó lavado de la placa con Buffer de lavado por tres veces y luego se agregó reactivo que contiene avidina conjugada con peroxidasa de

rábano (HRP). Se incubó por 30 minutos a 37°C, luego se repitió el proceso de lavado por cinco veces y se agregó el sustrato cromógeno tetrametilbenzidina (TMB). A continuación, se incubó por 20 minutos a 37°C. Las muestras donde se produjo la unión de la PCR con avidina conjugada a la enzima y el anticuerpo biotinilado mostraron un cambio colorimétrico.

Finalmente se añadió la solución de detención de la reacción que contiene ácido sulfúrico y se leyó la placa a una longitud de onda de 450 nm. La concentración de PCR de las muestras se determinó comparando los valores de densidad óptica (DO) con los de la curva estándar.

Análisis de concentraciones de FFC y FFC-a mediante cromatografía líquida.

Las concentraciones tisulares y séricas de FFC y FFC-a provenientes de conejos y ovinos se determinaron mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando el método de extracción descrito por Hormazábal *et al.* (1993) con modificaciones. En los conejos se utilizaron 0,5 g de tejidos previamente homogenizados (hígado, riñón, músculo, cerebro, bazo y pulmón) y 0,5 mL de plasma para el análisis. Muestras de plasma blanco y tejidos libres de fármacos fueron sobrecargadas con soluciones estándar de FFC disueltos en metanol, para obtener concentraciones finales de: 0,1-0,25-0,5-1-5-10 µg/mL para las muestras de plasma, y de 0,1-0,5-1-5-10 µg/g para las muestras de tejidos. Para determinar las concentraciones de FFC-a en las muestras de plasma y tejidos, éstas se sobrecargaron con soluciones patrón para obtener concentraciones finales de 0,1-0,25-0,5-1-5 µg/mL en plasma y de 0,1-0,5-1-5-10 µg/g para las muestras de tejidos.

En ovinos, las muestras de tejidos homogenizados (2 g en los análisis para hígado, riñón, músculo, cerebro, bazo y pulmón) y 1 mL para plasma fueron descongeladas para su procesamiento. Muestras blanco de tejidos y plasma se sobrecargaron con soluciones patrón estándar de FFC disuelto en metanol, para obtener concentraciones finales de 0,1-0,5-1-5-10 µg/mL para plasma y 0,1-0,5-1-5-10-20 µg/g para los tejidos. Para FFC-a, las muestras blanco de plasma ovino se sobrecargaron con soluciones patrón del estándar puro disuelto en metanol para obtener concentraciones finales de 0,1-0,25-0,5-1-2,5-5 µg/mL, mientras que los tejidos se sobrecargaron con concentraciones de 0,1-0,25-0,5-1-2,5-5 µg/g.

Tanto a las muestras sobrecargadas con FFC o FFC-a, como a las muestras experimentales se les adicionó 1 mL de agua grado HPLC y 4 mL de acetona, luego se agitaron en vórtex vertical (IKA-VIBRAX®-VXR) por 15 minutos y se centrifugaron a 3200 rpm por 10 minutos a 4°C (Centrífuga Centra CL3R, Thermo IEC, USA). Los sobrenadantes fueron transferidos a nuevos tubos y se repitió el paso de extracción agregando a la muestra 1 mL de agua HPLC y 2 mL de acetona. Las muestras se agitaron en vórtex por 15 minutos y se centrifugaron a 3200 rpm por 10 minutos a 4°C. Se colectaron y juntaron los sobrenadantes y se les adicionaron 3 mL de diclorometano. Luego se repitieron los pasos de agitación y centrifugación de la forma descrita anteriormente. Se descartó la fase superior acuosa y la fase inferior se evaporó a sequedad bajo flujo continuo de nitrógeno en baño termoregulado a 45°C (Memmert, Alemania). Las muestras fueron reconstituidas en 1 mL ó 500 µL de fase móvil en el caso de las muestras de ovinos y conejos, respectivamente, luego se adicionó 1 mL de hexano para limpiar la muestra. Posteriormente, la muestra se agitó por 15 minutos y se

centrifugó de la forma descrita anteriormente. La capa superior de hexano fue descartada y las muestras se filtraron con filtros Millipore® de 0,22 µm. Se utilizaron 200 µL de muestra para el análisis cromatográfico.

Condiciones cromatográficas

La fase móvil para el análisis de FFC estuvo compuesta por fosfato de potasio dihidrógeno (KH_2PO_4) (0,01 M), acetonitrilo (ACN) en proporción 90:10 v/v, adicionando 100 µL de trietilamina (TEA) y 2 mL de dodecil sulfato de sodio (SDS). El pH de la solución se ajustó a 4,0. Para el análisis de FFC-a, la fase móvil consistió en una mezcla de dos soluciones: A y B (68:32, v/v). La solución A compuesta por heptanosulfonato 0,02 M- trisodio fosfato 0,025 M (pH 3,85), se elaboró disolviendo 4,45 g/L de sal heptanosulfonato de sodio (Supelco) y 9,5 g/L de trisodio fosfato (Merck) en 750 mL de agua grado HPLC para aforar hasta 1 L de solución. La solución B estuvo compuesta de metanol conteniendo 0,1 % de trietilamina. La fase móvil de FFC fue bombeada a una velocidad de flujo de 0,8 mL/min y 0,6 mL/min para FFC-a, utilizando una columna analítica Supelcosil LC18 (4.6 x 150 mm; 5 µm; Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA) mantenida en horno a temperatura controlada de 30°C (CTO-10AS vp; Shimadzu, Kyoto, Japón) para la separación cromatográfica. Se utilizó un sistema de detección UV visible mediante detector UV (SPD-10Avp-Detector, Shimadzu, Japan) a una longitud de onda de 225 nm.

Validación de la metodología analítica

Los métodos analíticos para la determinación de las concentraciones de FFC y FFC-a fueron validados de acuerdo con las recomendaciones de organismos internacionales

como la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos (EMA, 1998). Para las muestras de plasma y tejidos de conejos y ovinos se utilizaron los parámetros de validación tales como: especificidad, linealidad, recuperación, exactitud, precisión, límite de cuantificación y límite de detección.

En plasma de conejos los valores promedio ± error estándar de los parámetros de validación del método analítico utilizado para determinar las concentraciones de FFC fueron 87,8 ± 4,1 % para el parámetro de recuperación, en cuanto a la linealidad el coeficiente de determinación (r^2) del método fue superior a 0,999. El coeficiente de variación (CV%) que da cuenta de la precisión fue inferior a un 5 %. El límite de cuantificación (LOQ) fue de 0,11 µg/mL y el límite de detección (LOD) fue de 0,05 µg/mL.

Para FFC-a, los promedios de recuperación fueron 70,6 ± 5,1 %, el coeficiente de determinación (r^2) fue superior a 0,999. El coeficiente de variación (CV%) fue inferior a un 5 %. El límite de cuantificación (LOQ) fue de 0,10 µg/mL y el límite de detección (LOD) fue de 0,05 µg/mL.

Los parámetros de validación del método analítico usado para determinar las concentraciones de FFC y su metabolito en tejidos de conejos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Parámetros de validación del método analítico utilizado para determinar concentraciones de florfenicol y florfenicol amina en diferentes tejidos de conejos.

Florfenicol						
Parámetro	Riñón	Hígado	Músculo	Pulmón	Bazo	Cerebro
Recuperación (%)	82,0 ± 1,8	80,5 ± 2,4	84,2 ± 2,5	83,0 ± 2,8	81,1 ± 2,7	86,2 ± 2,1
Linealidad (r^2)	0,9997	0,9988	0,9987	0,9996	0,9985	0,9997
Precisión (CV %)	4,2 ± 3,1	4,6 ± 3,4	3,7 ± 3,2	3,8 ± 0,7	2,8 ± 1,9	4,5 ± 3,5
Exactitud (%)	99,8 ± 6,4	101,2 ± 3,8	100,1 ± 6,5	97,0 ± 11,3	96,0 ± 12,1	100,3 ± 1,7
LOD (µg/g)	0,07	0,15	0,04	0,06	0,03	0,01
LOQ (µg/g)	0,15	0,22	0,06	0,09	0,04	0,06
Florfenicol-amina						
Parámetro	Riñón	Hígado	Músculo	Pulmón	Bazo	Cerebro
Recuperación (%)	76,6 ± 5,2	74,3 ± 2,2	75,9 ± 3,6	76,2 ± 2,6	78,9 ± 3,7	84,8 ± 4,3
Linealidad (r^2)	0,9992	0,9992	0,9993	0,9994	0,9996	0,9995
Precisión (CV %)	4,8 ± 4,3	6,2 ± 4,0	5,5 ± 4,6	2,7 ± 1,4	4,6 ± 3,2	3,2 ± 2,3
Exactitud (%)	99,3 ± 6,1	100,8 ± 2,1	95,8 ± 7,5	100,2 ± 6,2	100,4 ± 4,8	97,7 ± 2,5
LOD (µg/g)	0,02	0,03	0,02	0,02	0,01	0,01
LOQ (µg/g)	0,05	0,06	0,04	0,05	0,03	0,03

Resultados se expresan como promedio ± error estándar de la media. LOD: Límite de detección, LOQ: Límite de cuantificación. Fuente: Elaboración propia.

Los valores promedio de los parámetros de validación del método analítico utilizado para determinar concentraciones de FFC en plasma de ovinos fueron 89,1 ± 4,5 % para la recuperación de FFC, en cuanto a la linealidad el coeficiente de determinación (r^2) fue superior a 0,999, la precisión determinada por el coeficiente de variación (CV%) fue inferior a un 5 %. El límite de cuantificación (LOQ) fue de 0,13 µg/mL.

Para FFC-a, los promedios de recuperación fueron de 72,8 ± 4,6 %. El coeficiente de determinación (r^2) que determina la linealidad fue superior a 0,999. La precisión determinada por el coeficiente de variación (CV%) fue inferior a un 5 %, y el límite de cuantificación (LOQ) fue de 0,14 µg/mL.

Los promedios de parámetros de validación obtenidos para la determinación de FFC y FFC-a en tejidos de ovinos se describen en la Tabla 4 y Tabla 5, respectivamente.

Tabla 4. Parámetros de validación del método analítico utilizado para determinar concentraciones de florfenicol en tejidos de ovinos.

Parámetro	Riñón	Hígado	Músculo	Pulmón	Bazo	Cerebro
Recuperación (%)	70,0 ± 1,6	66,3 ± 2,7	75,2 ± 2,6	71,0 ± 2,5	79,1 ± 1,7	84,4 ± 1,8
Linealidad (r^2)	0,9967	0,9983	0,9967	0,9994	0,9988	0,9996
Precisión (CV%)	4,1 ± 3,5	4,4 ± 3,3	3,1 ± 4,0	3,6 ± 0,6	2,0 ± 1,5	4,5 ± 5,5
Exactitud (%)	99,7 ± 6,5	102,7 ± 8,4	106,1 ± 8,5	94,0 ± 12,3	95,0 ± 11,9	102,3 ± 1,2
LOD (µg/g)	0,03	0,06	0,03	0,009	0,01	0,006
LOQ (µg/g)	0,08	0,10	0,07	0,02	0,03	0,01

Resultados se expresan como promedio ± error estándar de la media. LOD: Límite de detección, LOQ: Límite de cuantificación. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 5. Parámetros de validación del método analítico utilizado para determinar concentraciones de florfenicol amina en tejidos de ovinos.

Parámetro	Riñón	Hígado	Músculo	Pulmón	Bazo	Cerebro
Recuperación (%)	69,6 ± 5,5	65,7 ± 2,2	65,9 ± 3,2	66,2 ± 2,7	78,7 ± 3,9	84,2 ± 5,3
Linealidad (r^2)	0,9992	0,9992	0,9993	0,9994	0,9996	0,9995
Precisión (CV%)	4,3 ± 4,8	6,7 ± 5,0	5,3 ± 4,8	1,7 ± 1,3	4,4 ± 4,2	3,0 ± 2,0
Exactitud (%)	99,7 ± 6,5	102,9 ± 7,3	95,0 ± 13,3	102,2 ± 6,6	100,6 ± 3,8	98,7 ± 2,9
LOD (µg/g)	0,02	0,03	0,02	0,02	0,01	0,01
LOQ (µg/g)	0,05	0,06	0,04	0,05	0,03	0,03

Resultados se expresan como promedio ± error estándar de la media. LOD: Límite de detección, LOQ: Límite de cuantificación. Fuente: Elaboración propia.

7. Análisis Farmacocinético.

Para el análisis de los parámetros farmacocinéticos de FFC y FFC-a se utilizó un modelo no compartimental y se realizaron los cálculos mediante el uso del programa PK Solutions 2.0 (Summit Research Services, Ashland, OH, USA).

Las concentraciones máximas ($C_{máx}$) y el tiempo en que se alcanzan las máximas concentraciones ($T_{máx}$) fueron calculados desde la curva concentración/tiempo correspondiente a cada animal. Las vidas medias de absorción ($t_{½ab}$) y distribución ($t_{½\alpha}$) fueron calculadas como ln $2/k_{ab}$ y ln $2/\alpha$, respectivamente, donde la tasa de absorción (k_{ab}) es la constante de absorción de primer orden y α es la constante de distribución de primer orden. La vida media de eliminación ($t_{1/2\lambda z}$) se calculó como $0,693/\lambda_z$, donde lambda $_z$ corresponde a la constante de eliminación de primer orden asociada con el segmento terminal de la curva de concentraciones en el tiempo.

El área bajo la curva de la concentración plasmática en el tiempo se calculó desde T_0 hasta el último tiempo de muestreo (AUC_{0-t}) utilizando el método de los trapecios. Se determinó también el área bajo la curva concentración vs tiempo desde cero al infinito ($AUC_{0-\infty}$), mediante la división de la última concentración experimental por la pendiente de la fase terminal λ_z.

El tiempo medio de residencia (TMR) se calculó mediante la fórmula:

$$TMR = \frac{AUMC_{0-\infty}}{AUC_{0-\infty}}$$

Donde: $AUMC_{0-\infty}$ es el área bajo la curva del primer momento estadístico y se calculó como el producto del tiempo por la concentración del fármaco en el tiempo.

El *Clearance* total se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$Cl_T = \frac{Dosis}{AUC_{0-\infty}}$$

El volumen de distribución en estado estacionario (Vd_{ss}) se calculó mediante:

$$Vd_{ss} = \frac{Dosis * AUMC_{0-\infty}}{(AUC_{0-\infty})^2}$$

La razón o relación de metabolito para FFC-a se calculó según la fórmula:

$$MR\% = \frac{AUC_{0-t}\,FFC\text{-}a}{AUC_{0-t}\,FFC} \times 100$$

8. Integración Parámetros PK/PD.

En los conejos del estudio se obtuvieron los índices PK/PD (*Pharmacokinetics/pharmacodynamics*), que relacionan la farmacocinética con la farmacodinamia para evaluar la eficacia de un antibiótico. La farmacodinamia corresponde a valores de MIC (del inglés; *Minimum inhibitory concentrations)* de FFC descritos para los patógenos más comunes de conejos. De esta manera se calcularon

los siguientes parámetros PK/PD de FFC: $C_{máx}$/MIC, AUC_{0-t}/MIC, y %T>MIC, los que indican las concentraciones máximas de FFC sobre MIC, el área bajo la curva sobre MIC, desde tiempo cero hasta el último muestreo y el porcentaje de tiempo durante el cual las concentraciones plasmáticas de FFC se mantienen por sobre los valores de MIC, respectivamente.

El %T>MIC se obtuvo mediante la siguiente fórmula (Koç *et al.,* 2015):

$$\%T > MIC = \ln (D / (Vd_{area} \times MIC)) \times (t_{1/2\,\lambda z} / \ln(2)) \times (100/ID)$$

Donde D corresponde a la dosis utilizada de FFC, Vd_{area} es el volumen de distribución (L), $t_{1/2\,\lambda z}$ es la vida media de eliminación (h) e ID corresponde al intervalo de dosis (h).

9. Análisis estadístico. Los resultados obtenidos para las variables farmacocinéticas fueron expresados como promedio (x) ± error estándar de la media (EEM), y comparados mediante la prueba de Mann-Whitney o t de student, según correspondiera, de acuerdo con el tipo de distribución de los datos. Para comparaciones entre varios grupos se aplicó la prueba de Kruskall Wallis o ANOVA según criterio anterior, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Se consideró un valor de *p* menor o igual a 0,05 para establecer diferencias estadísticamente significativas. Valores de *p* mayores a 0,05 y menores a 0,1 se consideraron como tendencia a ser significativos. Los cálculos estadísticos se realizaron mediante programa Infostat, (Córdoba, Argentina 2020).

RESULTADOS

ESTUDIOS EN CONEJOS

1. RESULTADOS DE ESTUDIOS EN CONEJOS

1.1. Objetivo 1A. Determinar el efecto de la respuesta inflamatoria aguda inducida por el lipopolisacárido de *E. coli* sobre la disposición plasmática de florfenicol y florfenicol amina, en conejos.

1.1.1. Evaluación de los efectos del lipopolisacárido de *E. coli* como inductor de respuesta inflamatoria aguda en conejos.

Posterior a la administración de LPS de *E. coli* en los conejos (a las 0 h, 6 h y 23,25 h), se observaron aumentos significativos ($p < 0.05$) de la temperatura corporal respecto de los conejos del grupo control. En la Figura 15 se observan los resultados expresados como porcentaje de cambio en la temperatura corporal (ΔT%), respecto del valor basal de cada grupo experimental. Los porcentajes de cambio de temperatura corporal fueron significativamente más elevados en el grupo tratado con LPS, respecto al grupo control, y respecto al valor basal del grupo LPS, siendo las diferencias más pronunciadas 1,25 h posterior a la primera administración de LPS, con un porcentaje de cambio de 4,1%. En el grupo de conejos tratados con LPS, la temperatura aumentó desde un valor basal de 38,8 ± 0,17 °C a un valor máximo de 40,4 ± 0,19 °C, reportándose un alza de 1,6 °C.

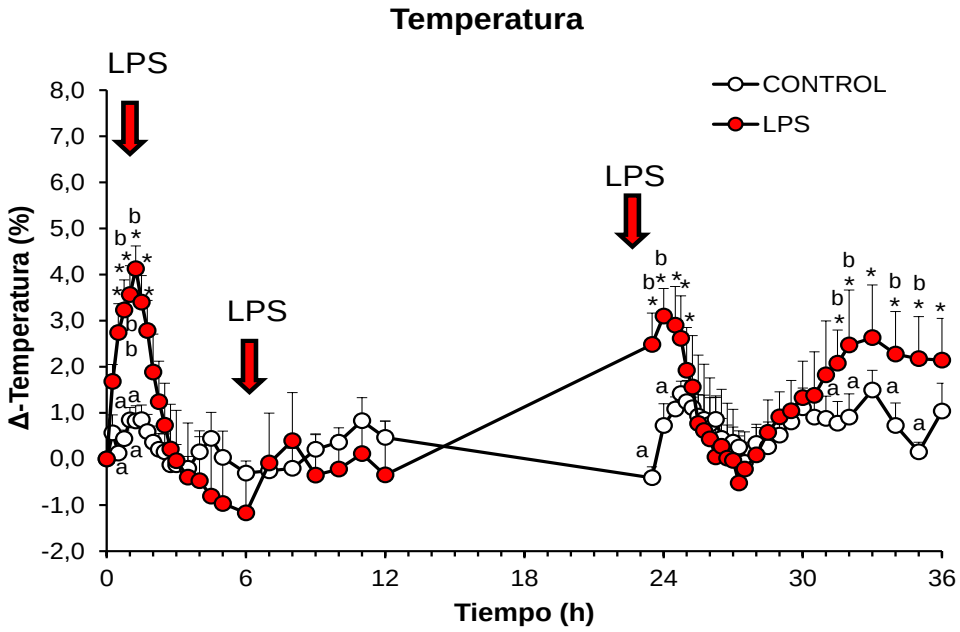

Figura 15. Variaciones de la temperatura corporal expresada como diferencia porcentual respecto al valor basal, en conejos control y conejos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli*. *: Diferencias significativas respecto a valor basal (p < 0,05). Letras minúsculas diferentes en sentido vertical (a, b) indican diferencias significativas entre grupos (p < 0,05). Valores representan promedios ± error estándar de la media. Flechas indican tiempo de administración de cada inyección de LPS. Fuente: Elaboración propia.

Tras la segunda inyección de LPS, el incremento de la temperatura corporal de los conejos fue menos pronunciado. Luego de la tercera inyección de LPS aplicada a las 24 h posteriores a la primera inyección de LPS se observó un incremento significativo de temperatura y posteriormente se produce un descenso de la temperatura corporal que es seguido por una nueva alza de temperatura con diferencias significativas entre ambos grupos entre las 31,5 h y 35 h posteriores a la primera administración de LPS. En la Figura 16 se presentan los promedios de concentraciones de IL-6 obtenidos en los conejos del estudio. En los animales tratados con LPS, las concentraciones de IL-6

fueron significativamente mayores que las concentraciones observadas en el grupo control ($p < 0,05$), a las 4, 8 y 12 h posteriores al tratamiento con el estímulo inflamatorio. En el grupo tratado con LPS se produjo un incremento significativo de la IL-6 respecto de los niveles basales a las 8 h de tratamiento. Estas concentraciones de IL-6 alcanzaron un máximo de 18,8 pg/mL a las 8 h posteriores a la administración de la endotoxina.

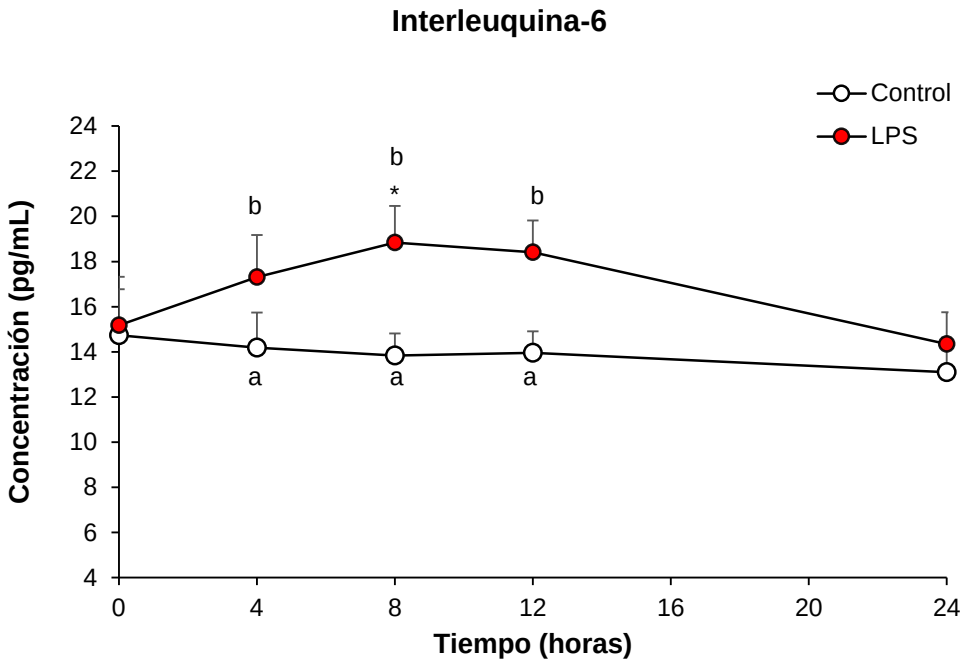

Figura 16: Concentraciones de interleuquina-6 en conejos control y conejos tratados con LPS de *E. coli.* *: diferencias significativas ($p < 0,05$), respecto a valor basal (T0). Letras diferentes en sentido vertical indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$). Valores indican promedios ± error estándar medio para n=5. Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 17 se muestran los promedios de concentraciones de PCR en conejos del grupo control y del grupo tratado con LPS. En los conejos del grupo tratado con LPS, las

concentraciones séricas de PCR aumentaron significativamente respecto del valor basal entre las 12 h y 24 h posteriores a la administración de la endotoxina. La comparación de los promedios de PCR entre ambos grupos determinó diferencias significativas para los valores obtenidos a las 24 h ($p < 0,05$).

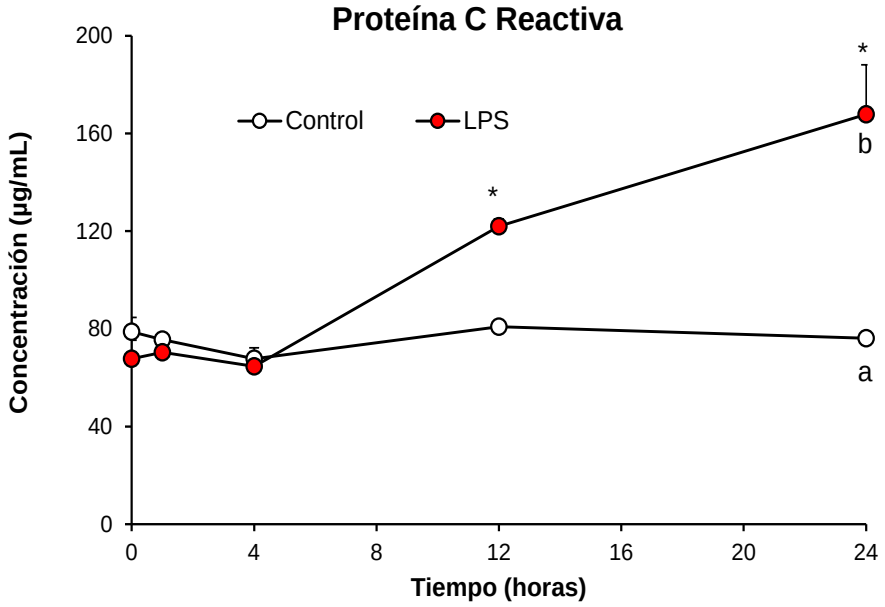

Figura 17: Concentraciones de proteína C reactiva en conejos control y conejos tratados con LPS de *E. coli.* *: diferencias significativas ($p < 0,05$), respecto a valor basal (T0). Letras diferentes en sentido vertical indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$). Valores indican promedios ± error estándar medio para n=5. Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 6 se presentan los resultados de los parámetros hematológicos expresados como promedio ± error estándar de la media (EEM) en los conejos del grupo control y del grupo tratado con LPS. Los promedios de VGA y concentración de hemoglobina no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos. En el grupo tratado con LPS se

observó una disminución significativa en el recuento de leucocitos totales, respecto de los promedios observados en el grupo control. Esta disminución se relaciona con un marcado descenso en los promedios de recuento de linfocitos, monocitos y neutrófilos entre 1 y 4 h posteriores a la primera inyección de LPS. A las 24 h posteriores a la primera administración de LPS los promedios de recuento de eosinófilos experimentaron un incremento significativo respecto del valor basal en los animales tratados con la endotoxina.

En la Tabla 6 también se observa que en el grupo tratado con LPS el recuento de plaquetas presentó disminuciones significativas a las 12 h posteriores a la administración de la endotoxina.

En las Tablas 7 y 8 se presentan los promedios ± EEM de las variables del perfil bioquímico obtenidos en los conejos control y conejos tratados con LPS de *E. coli* (n=5).

Tabla 6. Parámetros hematológicos obtenidos en conejos control y conejos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli.*

	GRUPO CONTROL					GRUPO TRATADO CON LPS				
	Tiempo (h)					Tiempo (h)				
Parámetro	**0**	**1**	**4**	**12**	**24**	**0**	**1**	**4**	**12**	**24**
VGA (%)	32,3 ± 1,6	32,4 ± 0,8	33,2 ± 0,7	31,4 ± 1,1	32,2 ± 1,1	35,4± 1,6	27,4 ± 6,9	32,4 ± 1,7	32,5 ± 1,4	31,7 ± 1,0
Hemoglobina *(g/dL)*	11,2 ± 0,7	11,2 ± 0,4	11,4 ± 0,2	10,7± 0,4	11,0 ± 0,5	12,1 ± 0,5	9,4 ± 2,3	11,3 ± 0,5	11,0 ± 0,4	10,8 ± 0,2
Leucocitos Totales *(N°/µL)*	6097,5 ± 624,1 a	5724± 190 a	5484± 503,7 a	4860 ± 365,6 a	4704 ± 494,3 a	5400 ± 126,5 a	1788 ± 135,6 b *	1206 ± 99,6 b *	3980 ± 424,6 a	5652 ± 756,7 a
Linfocitos *(N°/µL)*	2420,2 ± 641,8 a	2574,8 ± 316,7 a	2649,6 ± 552,3 a	1536 ± 407,2 a	2058 ± 486 a	1752,4 ± 488,6 a	559,2 ± 247,4 b	176 ± 176 b *	883,6 ± 261,1 a	1297,4 ± 410,6 a
Monocitos *(N°/µL)*	255,6 ± 89,3 a	214,4 ± 73,4 a	243,4 ± 58 a	165,6 ± 23,4 a	150,8 ± 27,9 a	174,4 ± 56,5 a	32,8 ± 17,4 b *	2,2 ± 2,2 b *	149,6 ± 36,6 a	182 ± 46,4 a
Neutrófilos *(N°/µL)*	1743,8 ± 468,2 a	2194,8 ± 408,4 a	2091,4 ± 484,1 a	2509,4 ± 330,1 a	1886,6 ± 260,6 a	1603,3 ± 307,6 a	424,6 ± 195,3 b	41,8 ± 41,8 b	2290,4 ± 248,7 a	2791,8 ± 601,2 a
Eosinófilos *(N°/µL)*	300 ± 149 a	448,4 ± 165,3 a	499,6 ± 218,3 a	379 ± 152,2 a	377,2 ± 159,6 a	421 ± 189 a	53,4 ± 29,4 a	99,5 ± 99,5 a	656,4 ± 163,7 a	1380,8 ± 299,8 b *
Plaquetas *(N°/µL)*	199,8 ± 26,7 a	265,8 ± 33,4 a	241,6 ± 33,5 a	234,2 ± 17,8 a	216,8 ± 12,3 a	230,3 ± 8,3 a	167,2 ± 48 a	157,2 ± 22,2 a	122,8 ± 24,5 b	128,4 ± 9,6 a

VGA: Volumen globular aglomerado. Valores representan promedios ± EEM para n=5 por grupo. Letras diferentes en sentido horizontal indican diferencias significativas entre grupos. * Diferencias significativas respecto a T0 valor basal ($p < 0,05$). Fuente: Elaboración propia.

Tabla 7. Parámetros bioquímicos sanguíneos obtenidos en conejos control y conejos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli*.

	GRUPO CONTROL					GRUPO TRATADO CON LPS				
	Tiempo (h)					Tiempo (h)				
Parámetro	**0**	**1**	**4**	**12**	**24**	**0**	**1**	**4**	**12**	**24**
ALT *(U/L)*	14,6 ± 5,4	11,2 ± 3,5	10,6 ± 2,9	12 ± 2,9	13,6 ± 4	18,4 ± 7,4	10,8 ± 4,5	9,4 ± 4,1	24,2 ± 16,2	16,2 ± 10,6
AST *(U/L)*	20,6 ± 6 a	17,8 ± 2,8 a	20,8 ± 2,5 a	20,2 ± 2,7 a	18,6 ± 2,6 a	19,2 ± 3,5 a	13,6 ± 3,7 a	28,8 ± 5,2 a	53,2 ± 7,7 b*	42,8 ± 19,9 a
Fosfatasa alcalina *(U/L)*	17,4 ± 3,4	16,8 ± 2,2	18 ± 2,3	13,6 ± 4,8	14,2 ± 2,9	20,4 ± 3,4	17,2 ± 4,4	20,8 ± 2,7	20 ± 5,2	14,6 ± 6,9
GGT *(U/L)*	5 ± 0,3 a	5,4 ± 1,0 a	5,2 ± 0,6 a	3,8 ± 0,9 a	4,4 ± 0,7 a	5,6 ± 0,9 a	4,8 ± 1,4 a	6,8 ± 1,6 a	13,6 ± 3,8 b	6,0 ± 2,5 a
Bilirrubina total *(µmol/L)*	5,8 ± 2,3	4,2 ± 1	5,6 ± 0,9	6,5 ± 1,8	5,9 ± 1	7,1 ± 1,7	3,4 ± 0,9	8,2 ± 2,5	8,9 ± 1,6	5,2 ± 2,3
Glucosa *(mmol/L)*	7,6 ± 0,8 a	7,3 ± 0,6 a	6,2 ± 0,5 a	5,6 ± 0,6 a	5,9 ± 0,8 a	6,2 ± 0,5 a	7,0 ± 1,8 a	11,4 ± 0,6 b*	3,7 ± 0,3 a	3,1 ± 1,3 a

Valores representan promedios ± EEM para n=5. Letras diferentes en sentido horizontal indican diferencias significativas entre grupos. * Diferencias significativas respecto a valor basal ($p < 0,05$). Fuente: Elaboración propia.

Tabla 8. Promedios de variables del perfil de bioquímica sanguínea obtenidos en conejos control y conejos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli*.

	GRUPO CONTROL					GRUPO TRATADO CON LPS				
	Tiempo (h)					Tiempo (h)				
Parámetro	**0**	**1**	**4**	**12**	**24**	**0**	**1**	**4**	**12**	**24**
Proteínas totales *(g/L)*	58,6 ± 2,0 a	54,2 ± 1,2 a	58,4 ± 3,0 a	52,8 ± 2,9 a	52,0 ± 4,0 a	59,6 ± 2,4 a	48,4 ± 12,1 a	47,4 ± 2,2 b*	49,0 ± 2,3 a*	39,4 ± 10,2 a*
Globulinas *(g/L)*	21,2 ± 1,5	19,0 ± 0,3	20,8 ± 1,5	17,8 ± 0,8	18,2 ± 1,7	21,8 ± 0,7	17,8 ± 4,5	15,8 ± 0,8	18,0 ± 1,1	22,8 ± 8,8
Albúmina *(g/L)*	37,8 ± 0,9 a	35,3 ± 1,2 a	37,6 ± 1,6 a	35 ± 2,6 a	33,8 ± 2,7 a	38 ± 1,8 a	30,6 ± 7,7 a	31,4 ± 1,6 b*	31,1 ± 1,4 a*	16,8 ± 6,9 b*
Relación A/G	1,8 ± 0,1	1,9 ± 0,1	1,8 ± 0,1	2,0 ± 0,2	1,9 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,5 ± 0,4	1,8 ± 0,2	1,8 ± 0,1	1,0 ± 0,4
Creatinina *(µmol/L)*	141,8 ± 8,5	145,2 ± 13,3	144,2 ± 11,2	129,0 ± 4,8	134,6 ± 12,8	128,0 ± 9,9	108,6 ± 27,9	132,0 ± 12,6	124,2 ± 14,4	88,8 ± 36,7
Urea *(mmol/L)*	9,9 ± 0,9	9,0 ± 0,7	8,6 ± 0,5	9,1 ± 0,4	8,7 ± 1,0	8,0 ± 1,1	6,0 ± 1,6	8,3 ± 0,5	8,0 ± 0,5	6,1 ± 2,6
Calcio *(mmol/L)*	3,2 ± 0,1	3,0 ± 0,1	2,9 ± 0,1	2,3 ± 0,3	2,7 ± 0,2	3,1 ± 0,1	2,2 ± 0,6	2,4 ± 0,1*	2,2 ± 0,2*	1,2 ± 0,5*
Fósforo *(mmol/L)*	1,3 ± 0,1 a	1,2 ± 0,1 a	1,2 ± 0,1 a	1,1 ± 0,0 a	1,0 ± 0,1 a	1,2 ± 0,1 a	0,8 ± 0,2 a*	0,6 ± 0,0 b*	1,1 ± 0,1 a	0,7 ± 0,3 a

Valores representan promedios ± EEM para n=5. Letras diferentes en sentido horizontal indican diferencias significativas entre grupos. * Diferencias significativas respecto a valor basal ($p < 0,05$). Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 7 se observa que la actividad de las enzimas hepáticas ALT y FA en los conejos tratados con LPS no mostraron diferencias significativas respecto de los promedios observados en el grupo control ($p > 0,05$). En cambio, en los conejos tratados con LPS la actividad de las enzimas AST y GGT presentaron incrementos significativos respecto del grupo control ($p < 0,05$) a las 12 h, el cual también fue significativo respecto de sus niveles basales en el caso de AST.

Como se muestra en la Tabla 8, a las 4 h y 24 h, posteriores a la primera inyección de LPS, en los conejos del grupo tratado con la endotoxina se observó un descenso significativo en los niveles de albúmina, respecto del grupo control. La comparación de las concentraciones de globulinas mostró una clara tendencia a ser diferentes entre ambos grupos experimentales ($p = 0,0523$). Los promedios de proteínas totales fueron significativamente menores en los conejos del grupo tratados con LPS, a las 4 h posteriores a la primera inyección de LPS. La relación albúmina/globulina no presentó cambios significativos entre ambos grupos experimentales ($p > 0,05$). Los marcadores de funcionalidad renal como las concentraciones de urea y creatinina tampoco mostraron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales ($p > 0,05$).

En los conejos del grupo tratado con LPS se observaron incrementos significativos en los promedios de concentración de glucosa, a las 4 h posterior a la primera administración de LPS (Tabla 7). Por su parte, las concentraciones de calcio y fósforo disminuyeron significativamente ($p < 0,05$), respecto de su valor basal, en los animales del grupo tratado con la endotoxina (Tabla 8).

1.1.2. Efectos de la respuesta inflamatoria aguda sobre la disposición plasmática de florfenicol y florfenicol amina en conejos.

1.1.2.1 Efectos de la respuesta inflamatoria aguda sobre la disposición plasmática de florfenicol y florfenicol amina en conejos posterior a la administración de florfenicol vía intravenosa.

En la Figura 18 se presentan las curvas semilogarítmicas de concentraciones plasmáticas en el tiempo de FFC en conejos control y conejos tratados con LPS de *E. coli,* posterior a la administración vía IV de una dosis de 20 mg/kg. En el grupo control se observaron concentraciones plasmáticas de 22,6 ± 2,35 µg/mL a las 0,03 h posteriores a la administración de FFC, las que declinaron de manera bifásica, y FFC fue detectado hasta las 8 h. En el grupo tratado con LPS las concentraciones plasmáticas de FFC fueron más elevadas que en el grupo control entre las 2 h y 12 h de muestreo, y estas diferencias fueron significativas a las 2 y 8 h posterior a la administración de FFC ($p < 0,05$). Las concentraciones declinaron de manera más paulatina en el grupo tratado con LPS, siendo detectadas hasta las 12 h de muestreo.

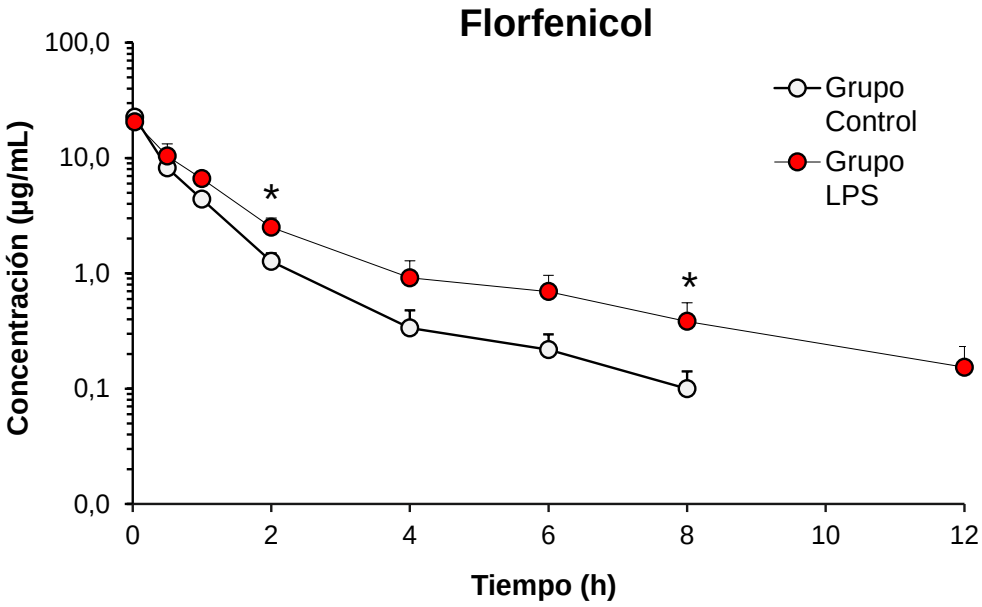

Figura 18. Curvas semilogarítimicas de concentraciones plasmáticas de florfenicol posterior a la administración de una dosis de 20 mg/kg vía intravenosa en conejos sanos y conejos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli.* Cada punto representa el promedio ± EEM (n=6). Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 9 se presentan los promedios de los parámetros farmacocinéticos de FFC en conejos control y conejos tratados con LPS de *E. coli*, obtenidos posterior a la administración de una dosis de 20 mg/kg vía IV. En los conejos cursando una RIA se observó un incremento significativo de los promedios de vida media de eliminación, área bajo la curva y tiempo medio de residencia de FFC, en comparación con los conejos sanos ($p < 0,05$). Estos cambios se asociaron a una disminución significativa del *clearance* de FFC, el cual disminuyó de 1228,2 ± 107,5 mL*h/kg a 806,4 ± 91,4 mL*h/kg en los conejos tratados con la endotoxina.

Tabla 9. Parámetros farmacocinéticos de florfenicol posterior a la administración intravenosa de 20 mg/kg en conejos control y conejos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli.*

Parámetro Farmacocinético	Control	LPS	Valor de *p*
K_{el} (1/h)	0,37 ± 0,12	0,17 ± 0,05	0,024*
$t_{1/2el}$ (h)	3,44 ± 0,57	5,59 ± 1,14	0,046*
AUC_{0-t} (µg* h/mL)	16,84 ± 1,24	25,67 ± 2,7	0,024*
$AUC_{0-\infty}$ (µg* h/mL)	17,18 ± 0,97	26,28 ± 2,7	0,024*
TMR (h)	1,10 ± 0,19	3,22 ± 0,95	0,024*
Vd_{ss} (mL)	1412 ± 234,5	2661 ± 939	0,546
CL (mL*h/kg)	1228,2 ± 107,5	806,4 ± 91,4	0,046*

Resultados se expresan como promedio ± EEM. *$p \leq 0,05$ vs Control. K_{el}: constante de eliminación; $t_{1/2el}$: vida media de eliminación; AUC_{0-t}: Área bajo la curva concentración vs tiempo desde cero al último tiempo de muestreo; $AUC_{0-\infty}$: Área bajo la curva concentración vs tiempo desde cero al infinito. TMR: tiempo medio de residencia; Vd_{ss}: volumen de distribución en estado estacionario; CL: *Clearance* (n=6). Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 19 se presentan las curvas de concentración plasmática en el tiempo de FFC-a posterior a la administración vía IV de una dosis de FFC de 20 mg/kg en conejos control y conejos tratados con LPS de *E. coli*.

Las concentraciones de FFC-a en los conejos del grupo tratado con LPS fueron menores que las concentraciones del grupo control, hasta las 2 h posteriores a la administración de FFC ($p<0,05$), pero presentaron una mayor persistencia en el tiempo, lo que se evidenció por un mayor TMR en los conejos tratados con LPS, en comparación con el grupo control.

Las concentraciones de FFC-a alcanzaron promedios de 0,97 ± 0,31 µg/mL en el grupo tratado con LPS, mientras que en el grupo control los mayores promedios de concentraciones fueron de 2,76 ± 0,53 µg/mL. Estas concentraciones se alcanzaron 1 h posterior a la administración de FFC.

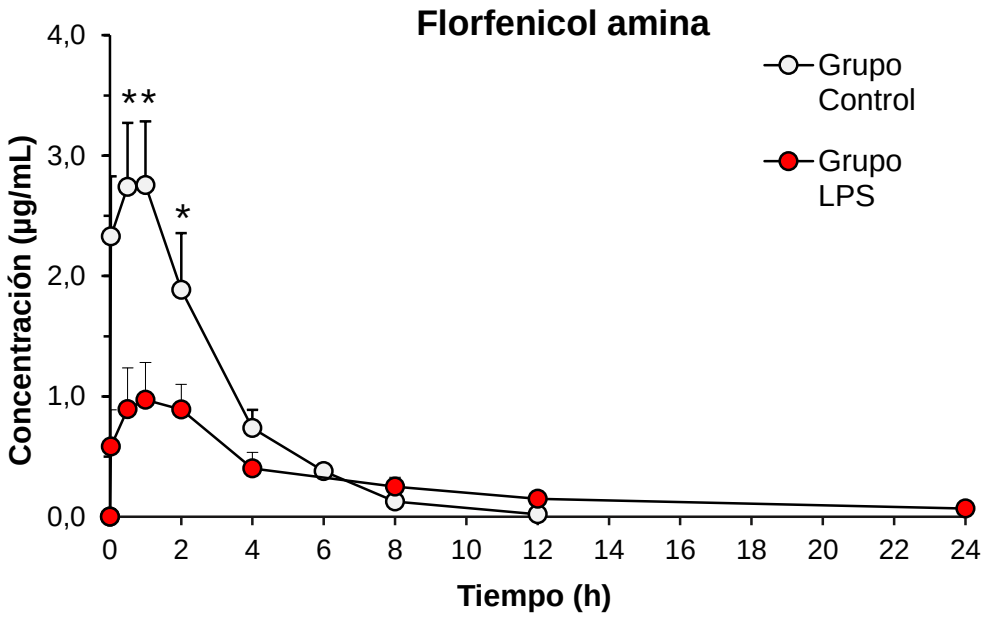

Figura 19. Curvas de concentraciones plasmáticas de florfenicol amina en conejos sanos y tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli.* Cada punto representa el promedio ± EEM posterior a la administración de una dosis de 20 mg/kg vía intravenosa de florfenicol (n=6). Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 10 se presentan los promedios ± EEM para los parámetros farmacocinéticos de FFC-a en conejos, posterior a la administración vía IV de una dosis de FFC de 20 mg/kg. Los valores de $C_{máx}$, AUC_{0-t}, $AUC_{0-\infty}$, fueron significativamente menores en los conejos tratados con LPS que en los conejos sanos ($p < 0,05$). En cambio, los promedios

de vida media de eliminación y TMR presentaron un incremento significativo en los conejos tratados con LPS, en comparación con los conejos control. La proporción de metabolito (MR%), del grupo LPS (22,0 ± 5,3 %) fue significativamente menor que el MR del grupo control que fue de 57,8 ± 9,2 %.

Tabla 10. Parámetros farmacocinéticos de florfenicol amina posterior a la administración intravenosa de 20 mg/kg de florfenicol en conejos tratados con solución salina (control) y tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli.*

Parámetro Farmacocinético	**Control**	**LPS**	**Valor de *p***
$C_{máx}$ (µg/mL)	2,85 ± 0,34	1,10 ± 0,26	0,0017*
$T_{máx}$ (h)	0,80 ± 0,10	1,42 ± 0,27	0,029*
K_{el} (1/h)	0,44 ± 0,03	0,28 ± 0,06	0,0176*
$t_{1/2el}$ (h)	1,61 ± 0,11	3,32 ± 0,93	0,0491*
AUC_{0-t} (µg* h/mL)	9,68 ± 1,14	5,17 ± 1,27	0,0158*
$AUC_{0-\infty}$ (µg* h/mL)	9,68 ± 1,14	5,3 ± 1,33	0,0158*
TMR (h)	2,56 ± 0,23	4,42 ± 1,00	0,050*
MR %	57,6 ± 7,5	22,0 ± 5,3	0,0048*

Resultados se expresan como promedio ± EEM. *$p \leq 0,05$ vs Control. $C_{máx}$: concentración máxima; $T_{máx}$: Tiempo en alcanzar $C_{máx}$; K_{el}: constante de eliminación; $t_{1/2el}$: vida media de eliminación; AUC_{0-t}: Área bajo la curva concentración vs tiempo desde cero al último tiempo de muestreo; $AUC_{0-\infty}$: Área bajo la curva concentración vs tiempo desde cero al infinito. TMR: tiempo medio de residencia; MR%: Relación metabolito/FFC en porcentaje (n=6). Fuente: Elaboración propia.

1.1.2.2 Efectos de la respuesta inflamatoria aguda sobre la disposición plasmática de florfenicol en conejos posterior a la administración de florfenicol vía intramuscular.

En la Figura 20 se observan las curvas semilogarítmicas de concentraciones plasmáticas en el tiempo de FFC en conejos control y conejos tratados con LPS de *E. coli,* posterior a la administración de 20 mg/kg vía IM. En el grupo control el mayor promedio de concentración plasmática fue de 6,3 ± 0,5 µg/mL a las 1,5 h posteriores a la administración de FFC, luego se produce un descenso gradual a partir de las 4 h posterior al tratamiento con FFC. Mientras que en el grupo tratado con LPS la mayor concentración plasmática promedio fue de 7,3 ± 0,9 µg/mL a las 1,5 h de muestreo, y se mantuvo en ese valor hasta las 2 h de muestreo. Las concentraciones declinan paulatinamente hasta alcanzar valores de 0,34 ± 0,06 µg/mL a las 12 h de muestreo. Se puede observar que las concentraciones plasmáticas de FFC en el grupo de conejos tratado con LPS son significativamente superiores a las del grupo control a las 4 h posterior a la administración de LPS ($p < 0,05$).

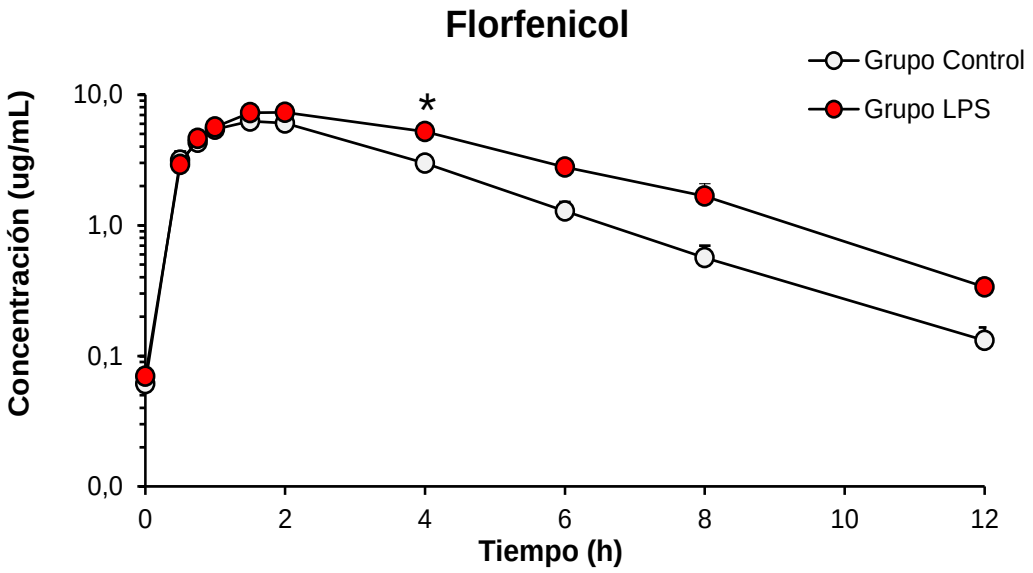

Figura 20. Curvas semilogarítimicas de concentraciones plasmáticas de florfenicol posterior a la administración de una dosis de 20 mg/kg vía intramuscular en conejos sanos y conejos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli.* Cada punto representa el promedio ± EEM (n=5). Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 11 se presentan los promedios de los parámetros farmacocinéticos de FFC en conejos control y conejos tratados con LPS de *E. coli*, tratados con una dosis de 20 mg/kg vía IM. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos al comparar los promedios de concentración máxima ($C_{máx}$) y tiempo en que se alcanzan las concentraciones máximas ($T_{máx}$). En cambio, se observaron diferencias significativas entre ambos grupos para el tiempo de vida media de absorción. No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los grupos control y tratado con LPS, al comparar las variables de constante de distribución, vida media de distribución, constante de eliminación y vida media de eliminación. Los valores de área bajo la curva fueron significativamente mayores en el grupo tratado con LPS al comparar con los

conejos controles, lo cual se relaciona con un incremento significativo en el tiempo medio de residencia de FFC en los conejos tratados con LPS.

Tabla 11. Parámetros farmacocinéticos de florfenicol posterior a la administración intramuscular de 20 mg/kg en conejos control y conejos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli.*

Parámetro Farmacocinético	**Control**	**LPS**	**Valor de *p***
$C_{máx}$ (µg/mL)	6,65 ± 0,30	7,85 ± 0,65	0,101
$T_{máx}$ (h)	1,60 ± 0,19	1,80 ± 0,12	0,683
K_{ab} (1/h)	2,01 ± 0,56	1,11 ± 0,19	0,222
$t_{1/2\ ab}$ (h)	0,44 ± 0,09	0,72 ± 0,13	0,024*
K_{α} (1/h)	0,67 ± 0,21	0,78 ± 0,14	0,759
$t_{1/2\ \alpha}$ (h)	2,26 ± 1,22	0,99 ± 0,15	0,587
K_{el} (1/h)	0,37 ± 0,01	0,34 ± 0,03	0,392
$t_{1/2el}$ (h)	1,88 ± 0,06	2,05 ± 0,15	0,361
AUC_{0-t} (µg* h/mL)	25,57 ± 1,28	38,85 ± 3,77	0,016*
$AUC_{0-\infty}$ (µg* h/mL)	25,94 ± 1,34	39,87 ± 3,80	0,016*
TMR (h)	3,28 ± 0,23	4,18 ± 0,22	0,005*

Resultados se expresan como promedio ± EEM. *$p \leq 0,05$ vs Control. $C_{máx}$: concentración máxima; $T_{máx}$: Tiempo en alcanzar $C_{máx}$; K_{ab}: constante de absorción; $t_{1/2ab}$: vida media de absorción; K_{α}: constante de distribución; $t_{1/2\alpha}$: vida media de distribución; K_{el}: constante de eliminación; $t_{1/2el}$: vida media de eliminación; AUC_{0-t}: Área bajo la curva concentración vs tiempo desde cero al último tiempo de muestreo; $AUC_{0-\infty}$: Área bajo la curva concentración vs tiempo desde cero al infinito. TMR: tiempo medio de residencia (n=5). Fuente: Elaboración propia.

Integración parámetros PK/PD de FFC en conejos.

Para calcular los parámetros PK/PD en los conejos del estudio, se tomaron en consideración valores de concentración mínima inhibitoria 90 (MIC_{90}) en un rango entre 0,25 µg/mL y 2 µg/mL, descritos para FFC frente a patógenos relevantes que causan infecciones respiratorias en conejos: *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica* (Koc *et al.* 2015). Se calcularon los siguientes parámetros: $C_{máx}$/MIC, AUC_{0-t}/MIC, y %T>MIC, según se presenta en la Tabla 12 y Tabla 13. Estos parámetros indican las concentraciones máximas de FFC sobre MIC ($C_{máx}$/MIC), el área bajo la curva sobre MIC, desde tiempo cero hasta el último muestreo (AUC_{0-t}/MIC) y el porcentaje de tiempo durante el cual las concentraciones plasmáticas de FFC se mantienen por sobre los valores de MIC (%T>MIC). Para la relación $C_{máx}$/MIC, las concentraciones plasmáticas máximas de FFC fueron más de 20 veces superiores que las MICs de 0,25 µg/mL en los conejos control y tratados con LPS. En el caso de las MICs de 0,5 µg/mL superaron más de 10 veces este valor, y para las MICs de 1 y 2 µg/mL más de 3 veces. Los promedios de AUC_{0-t}/MIC fueron significativamente mayores en el grupo de conejos tratados con LPS ($p < 0,05$) (Tabla 12).

Tabla 12. Integración PK/PD para los parámetros $C_{máx}$/MIC y AUC/MIC de florfenicol en plasma de conejos para *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica,* posterior a la administración de una dosis de 20 mg/kg vía intramuscular en conejos control y tratados con LPS.

Parámetro	Control	LPS	Valor de *p*
MIC_{90} (0,25 µg/mL).			
$C_{Máx}$/MIC	26,6 ± 1,1	31,4 ± 2,6	0,099
AUC_{0-t}/MIC (h)	102,3 ± 5,1	155,4 ± 15,1	0,016*
MIC_{90} (0,5 µg/mL).			
$C_{Máx}$/MIC	13,3 ± 0,6	15,7 ± 1,3	0,099
AUC_{0-t}/MIC (h)	51,1 ± 2,6	77,7 ± 7,5	0,016*
MIC_{90} (1 µg/mL).			
$C_{Máx}$/MIC	6,7 ± 0,3	7,9 ± 0,7	0,100
AUC_{0-t}/MIC (h)	25,6 ± 1,3	38,8 ± 3,8	0,016*
MIC_{90} (2 µg/mL).			
$C_{Máx}$/MIC	3,3 ± 0,2	3,9 ± 0,3	0,100
AUC_{0-t}/MIC (h)	12,8 ± 0,6	19,4 ± 1,9	0,016*

Resultados se expresan como promedio ± error estándar de la media. *p ≤ 0,05 vs Control. MIC_{90}: Concentración donde el 90 % de microorganismos son inhibidos en su crecimiento. Se consideraron MICs en el rango entre 0,5 y 2 µg/mL descritos para *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica* en conejos (n=5). Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 13 se muestran los valores de %T>MIC, donde se puede observar que en el caso de un intervalo de administración de FFC de 8 h, las concentraciones plasmáticas del antibiótico superan los valores de MIC de 0,25 y 0,5 µg/mL alrededor de un 100 % del tiempo. En cambio, cuando se considera un intervalo de 12 h, solo el grupo tratado

con LPS alcanza valores cercanos al 100% en el % de tiempo que las concentraciones de FFC superan los valores de MIC de 0,25 µg/mL.

Tabla 13. Integración PK/PD para el parámetro %T>MIC de florfenicol en plasma de conejos para *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica,* posterior a la administración de una dosis de 20 mg/kg vía intramuscular en conejos control y tratados con LPS.

Parámetro PK/PD	Intervalo de dosis	
%T>MIC	8 h	12 h
MIC_{90} (0,25 µg/mL).		
Control	123,5 ± 0,8 a	82,3 ± 0,6 a*
LPS	147,0 ± 4,7 b	98,0 ± 3,2 b*
MIC_{90} (0,5 µg/mL).		
Control	100,0 ± 0,9 a	66,7 ± 0,6 a*
LPS	121,4 ± 5,2 b	80,9 ± 3,5 b*
MIC_{90} (1 µg/mL).		
Control	76,5 ± 0,9 a	51,0 ± 0,6 a*
LPS	95,8 ± 5,2 b	63,9 ± 3,5 b*
MIC_{90} (2 µg/mL).		
Control	53 ± 0,9 a	35,3 ± 0,6 a*
LPS	70,2 ± 5,2 b	45,8 ± 3,5 b*

Resultados se expresan como porcentaje ± EEM, %T>MIC se calculó para MICs de 0,25, 0,5, 1 y 2 µg/mL, considerando los antecedentes de valores de MICs reportados para *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica.* MIC_{90}: Concentración donde el 90 % de microorganismos ve inhibido su crecimiento (n=5). Letras diferentes en sentido vertical indican diferencias significativas entre los tratamientos, *: diferencias significativas para el factor tiempo (intervalo de dosis), *$p < 0,05$ (n=5). Fuente: Elaboración propia.

1.1.2.3 Efectos de la respuesta inflamatoria aguda sobre la disposición plasmática de florfenicol amina en conejos posterior a la administración de florfenicol vía intramuscular.

En la Figura 21 se presentan las curvas de concentraciones plasmáticas en el tiempo de FFC-a posterior a la administración de una dosis de FFC de 20 mg/kg vía IM en conejos control y conejos tratados con LPS de *E. coli*. En la fase inicial de la curva se observa que la formación del metabolito FFC-a en plasma se evidencia a contar de las 0,5 h posteriores a la administración de FFC, presentando ambas curvas un patrón similar de incrementos en sus niveles plasmáticos. Las concentraciones de FFC-a alcanzaron promedios de 1,6 ± 0,2 µg/mL en el grupo tratado con LPS, a las 2 h de muestreo. En el grupo control las mayores concentraciones fueron de 1,7 ± 0,2 µg/mL a las 4 h de muestreo. Desde las 6 h de muestreo, las concentraciones de FFC-a decaen paulatinamente hasta alcanzar un promedio de 0,25 ± 0,04 µg/mL en el grupo control y de 0,44 ± 0,05 µg/mL, en el grupo tratado con LPS, a las 12 h de muestreo. Se observaron diferencias significativas entre ambos grupos con mayores concentraciones del metabolito en los conejos tratados con LPS a las 1,5 y 8 h posteriores a la administración de FFC ($p < 0,05$).

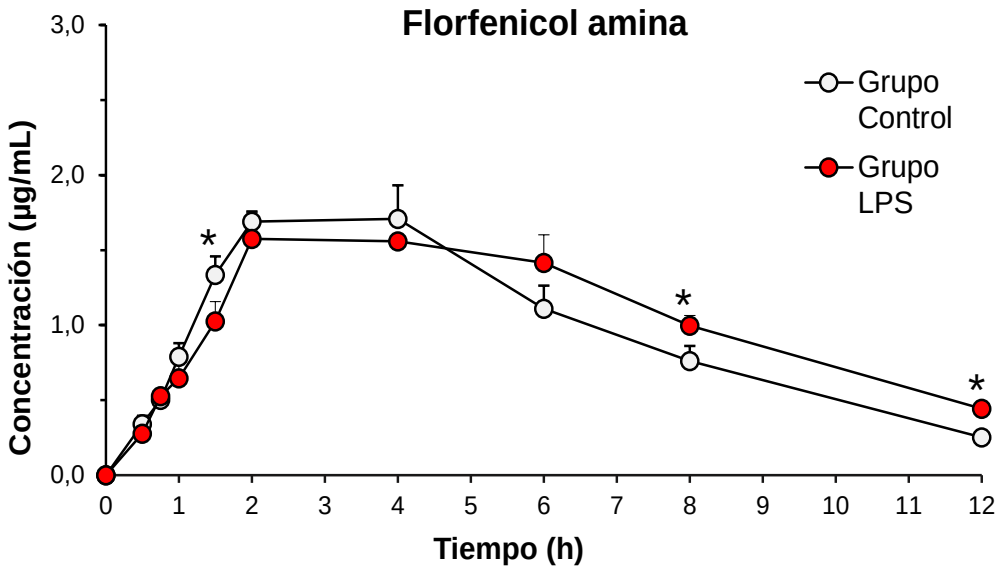

Figura 21. Curvas de concentraciones plasmáticas de florfenicol amina en conejos sanos y tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli.* Cada punto representa el promedio ± EEM posterior a la administración de una dosis de 20 mg/kg vía intramuscular de florfenicol (n=5). Fuente: Elaboración propia.

Los promedios ± EEM para los parámetros farmacocinéticos de FFC-a en conejos, posterior a la administración de una dosis de FFC de 20 mg/kg vía IM se muestran en la Tabla 14. Los valores correspondientes a la tasa de eliminación en el grupo tratado con LPS (0,21 ± 0,02 h^{-1}) fueron significativamente (p = 0,0203) menores respecto de los observados en el grupo control, los que fueron de 0,28 ± 0,01 h^{-1}. En relación con lo anterior, el promedio de vida media de eliminación mostró una tendencia a ser significativamente mayor en el grupo tratado con LPS (3,49 ± 0,38 h; p = 0,0625) respecto al grupo control (2,46 ± 0,13 h). El área bajo la curva desde tiempo cero al infinito para FFC-a fue significativamente mayor en los conejos tratados con la endotoxina (15,09 ± 0,51 µg* h/mL), al igual que el tiempo medio de residencia del metabolito el cual presentó valores de 7,29 ± 0,48 h, el que fue significativamente mayor

al observado en los conejos del grupo control. Por otra parte, la proporción de metabolito (MR; del inglés *metabolite ratio*), presentó una tendencia (*p* = 0,064) a ser significativamente menor en los animales tratados con LPS respecto del grupo control.

Tabla 14. Parámetros farmacocinéticos de florfenicol amina posterior a la administración intramuscular de 20 mg/kg de florfenicol en conejos tratados con solución salina (control) y tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli.*

Parámetro Farmacocinético	**Control**	**LPS**	**Valor de *p***
$C_{máx}$ (µg/mL)	1,90 ± 0,14	1,79 ± 0,16	0,6905
$T_{máx}$ (h)	3,20 ± 0,49	3,6 ± 0,75	0,9999
Kf_m (1/h)	0,62 ± 0,08	0,55 ± 0,09	0,6802
$t_{1/2\ fm}$ (h)	1,20 ± 0,15	1,36 ± 0,19	0,5432
$K_α$ (1/h)	0,49 ± 0,16	0,38 ± 0,19	0,7397
$t_{1/2\ α}$ (h)	2,05 ± 0,60	0,83 ± 1,42	0,4816
K_{el} (1/h)	0,28 ± 0,01	0,21 ± 0,02	0,0203*
$t_{1/2el}$ (h)	2,46 ± 0,13	3,49 ± 0,38	0,0625
AUC_{0-t} (µg* h/mL)	11,75 ± 0,99	12,79 ± 0,43	0,1436
$AUC_{0-∞}$ (µg* h/mL)	12,68 ± 1,13	15,09 ± 0,51	0,0529*
TMR (h)	5,63 ± 0,34	7,29 ± 0,48	0,0242*
MR %	45,49 ± 3,92	33,98 ± 3,03	0,0641

Resultados se expresan como promedio ± EEM. *$p \leq 0,05$ vs Control. $C_{máx}$: concentración máxima; $T_{máx}$: Tiempo en alcanzar $C_{máx}$; K_{fm}: constante de formación del metabolito; $t_{1/2\ fm}$: vida media de formación del metabolito; $K_{α:}$ constante de tasa de distribución; $t_{1/2\ α}$: vida media de distribución; K_{el}: constante de eliminación; $t_{1/2el:}$ vida media de eliminación; AUC_{0-t}: Área bajo la curva concentración vs tiempo desde cero al último tiempo de muestreo; $AUC_{0-∞}$: Área bajo la curva concentración vs tiempo desde cero al infinito. TMR: tiempo medio de residencia; MR%: Relación metabolito/FFC en porcentaje (n=5). Fuente: Elaboración propia.

1.2. Objetivo 2A. Determinar el efecto de la respuesta inflamatoria aguda inducida por el lipopolisacárido de *E. coli* sobre la distribución tisular de florfenicol y florfenicol amina, en conejos.

1.2.1. Efectos de la respuesta inflamatoria aguda sobre la distribución tisular de florfenicol y florfenicol amina en conejos.

Las concentraciones tisulares de FFC observadas en ambos grupos de conejos se presentan en la Figura 22. En el grupo control las concentraciones más altas se observaron en riñón (7,85 ± 1,46 µg/g), seguidas en orden decreciente por músculo (4,59 ± 0,94 µg/g), bazo (4,12 ± 0,66 µg/g), pulmón (3,79 ± 0,75 µg/g), hígado (2,66 ± 0,56 µg/g) y cerebro (1,01 ± 0,07 µg/g). En los conejos tratados con LPS las concentraciones tisulares de FFC siguieron el mismo orden decreciente y fueron mayores a las observadas en el grupo control, con valores promedio de 11,14 ± 2,92 µg/g en riñón; 9,05 ± 1,59 µg/g en músculo; 7,66 ± 1,85 µg/g en bazo; 7,16 ± 1,82 µg/g en pulmón; 5,56 ± 2,04 µg/g en hígado y 1,45 ± 0,33 µg/g en cerebro. Se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para los promedios de concentración de FFC observados en músculo (p =0,037) y se observó una tendencia en pulmón (p = 0,093) a presentar mayores concentraciones en el grupo tratado con LPS. En los demás tejidos no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

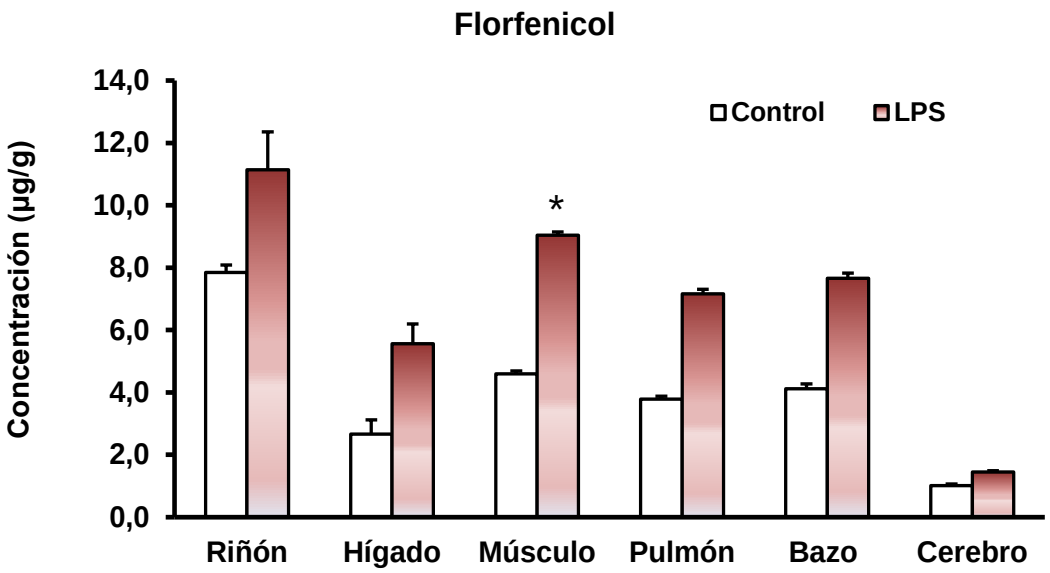

Figura 22. Promedios (± EEM) de concentraciones tisulares de florfenicol administrado vía intramuscular en dosis de 20 mg/kg en conejos control y conejos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (n=6) * $p \leq 0,05$. Fuente: Elaboración propia.

La relación Tejido/Plasma de FFC calculada para cada uno de los tejidos tanto para los conejos del grupo control como los del grupo tratado con LPS se muestran en la Figura 23.

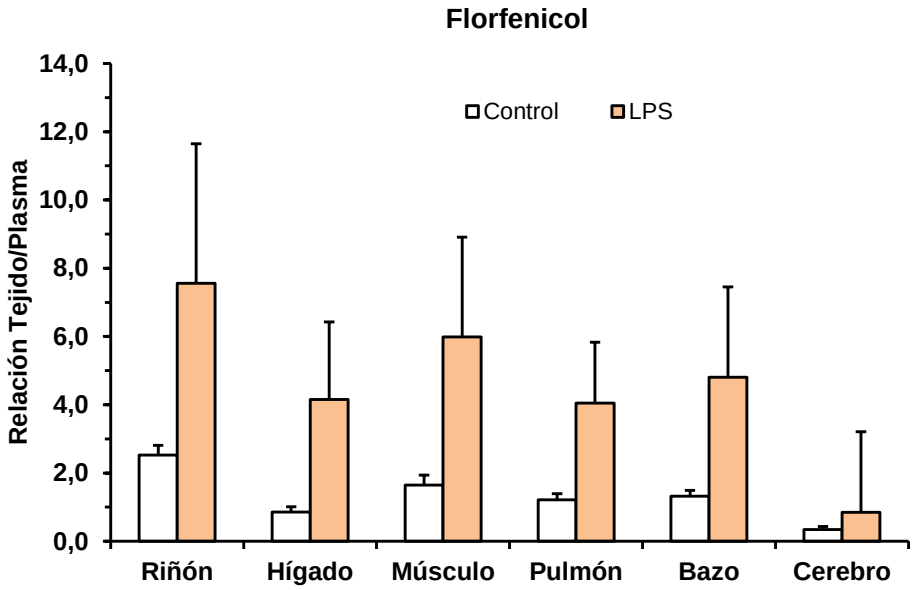

Figura 23. Promedios (± EEM) de relaciones tejido/plasma de florfenicol administrado vía intramuscular en dosis de 20 mg/kg en conejos control y conejos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (n=6). Fuente: Elaboración propia.

La relación tejido/plasma permite estimar la proporción de FFC que se distribuye a los tejidos. Los valores para la relación tejido/plasma son mayores en todos los tejidos del grupo tratado con LPS, sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales ($p > 0,05$).

En la Figura 24 se muestran las concentraciones tisulares de FFC-a. En los conejos del grupo control las mayores concentraciones se obtuvieron en muestras de riñón (9,69 ± 1,57 µg/g), seguido en forma decreciente por hígado (5,92 ± 1,06 µg/g), bazo (4,77 ± 1,44 µg/g), pulmón (2,21 ± 0,58 µg/g), músculo (1,42 ± 0,27 µg/g), y cerebro (0,70 ± 0,14 µg/g). En el grupo tratado con LPS las concentraciones tisulares de FFC-a fueron significativamente superiores en hígado (11,45 ± 1,63 µg/g; $p = 0,0077$), músculo (2,95 ± 0,63 µg/g; $p = 0,0260$), y bazo (10,07 ± 2,36 µg/g; $p = 0,0411$), respecto de las

concentraciones de FFC-a observadas en el grupo control. En pulmón se observó una tendencia (p = 0,0886) a mayores concentraciones en los conejos tratados con LPS. En riñón las concentraciones de FFC-a en el grupo tratado con LPS fueron de 14,22 ± 2,92 µg/g. En pulmón las concentraciones fueron de 5,02 ± 1,61 µg/g, mientras que en cerebro las concentraciones de FFC-a fueron de 1,29 ± 0,33 µg/g para el grupo tratado con LPS.

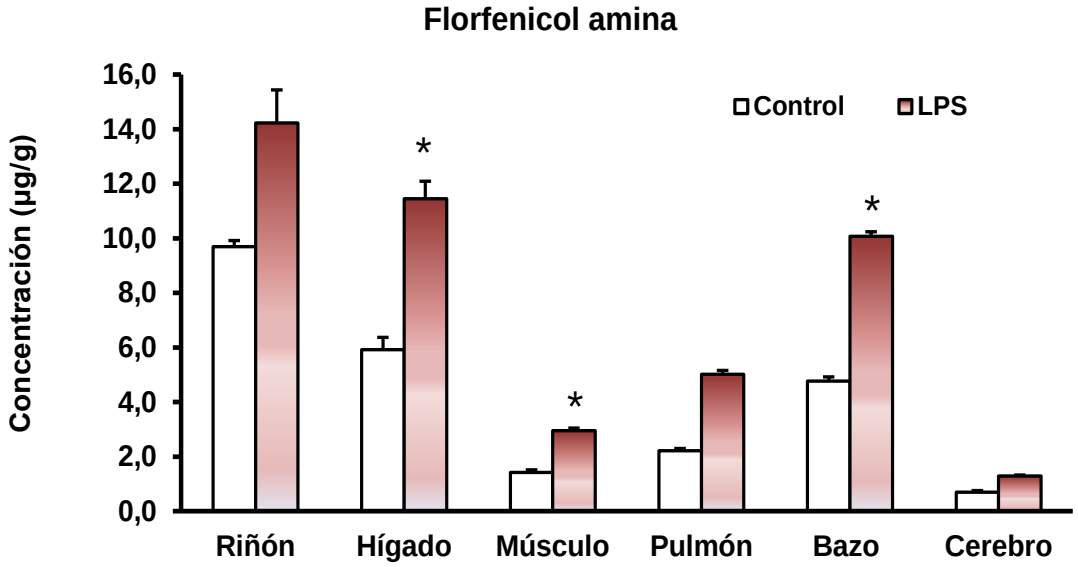

Figura 24. Promedios ± EEM de concentraciones tisulares de florfenicol amina posterior a la administración de florfenicol vía intramuscular en dosis de 20 mg/kg en conejos control y conejos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (n=6) * $p \leq 0,05$. Fuente: Elaboración propia.

Las relaciones tejido/plasma, calculadas para el metabolito FFC-a en los conejos del grupo control y del grupo tratado con LPS, se muestran en la Figura 25. Al comparar los promedios de la relación tejido/plasma de FFC-a para los diferentes tejidos no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales.

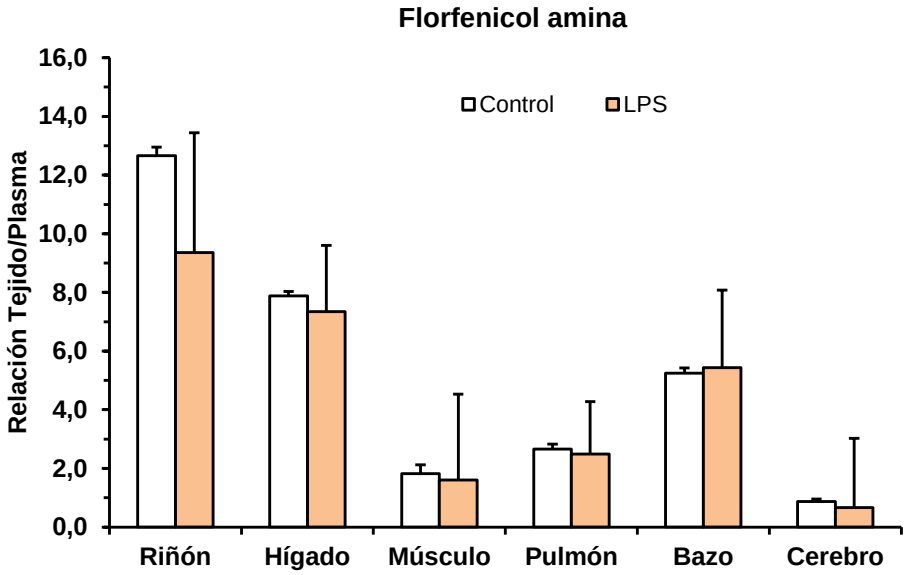

Figura 25. Promedios (± EEM) de la relación tejido/plasma de florfenicol amina en conejos control y conejos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (n=6) posterior a la administración vía intramuscular de florfenicol en dosis de 20 mg/kg. Fuente: Elaboración propia.

RESULTADOS
ESTUDIOS EN OVINOS

2. RESULTADOS DE ESTUDIOS EN OVINOS

2.1. Objetivo 1B. Determinar el efecto de la respuesta inflamatoria aguda inducida por el lipopolisacárido de *E. coli* sobre la disposición plasmática de florfenicol y florfenicol amina, en ovinos.

2.1.1. Evaluación de los efectos del lipopolisacárido de *E. coli* como inductor de respuesta inflamatoria aguda en ovinos.

Posterior a la administración de LPS de *E. coli* en los ovinos (a las 0 h, 8 h y 23,25 h), se observó un incremento de la temperatura corporal en los animales tratados con la endotoxina, el cual alcanzó su máximo aumento promedio 8 h después de la primera inyección de LPS, con un alza desde un valor basal de 39,4 ± 0,12 °C hasta 40,6 ± 0,06 °C en el grupo tratado con LPS. En la Figura 26 se presentan los resultados de TC expresados como porcentaje de cambio respecto del valor basal (∆T%), para cada tiempo de medición. En los ovinos tratados con LPS se observaron aumentos significativos de la TC ($p < 0,05$) respecto de los promedios del grupo control desde las 0,75 h hasta las 2 h posterior a la primera inyección de LPS. Posteriormente se observaron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales entre las 2,5 h hasta las 9,5 h posteriores a la primera administración de LPS. El mayor aumento de temperatura fue de 4,5% (1,1°C) luego de la segunda inyección de LPS con un alza desde 39,5 ± 0,14 °C en el grupo control hasta 40,6 ± 0,06 °C en los animales tratados con LPS. Tras la segunda inyección de LPS, la TC de los ovinos se mantuvo elevada por al menos 12 horas. El incremento de 1,2 °C de la TC en el grupo tratado con la endotoxina, respecto a su valor basal de temperatura permitió confirmar el

establecimiento de una RIA inducida por la administración de LPS de *E. coli* en los ovinos del estudio.

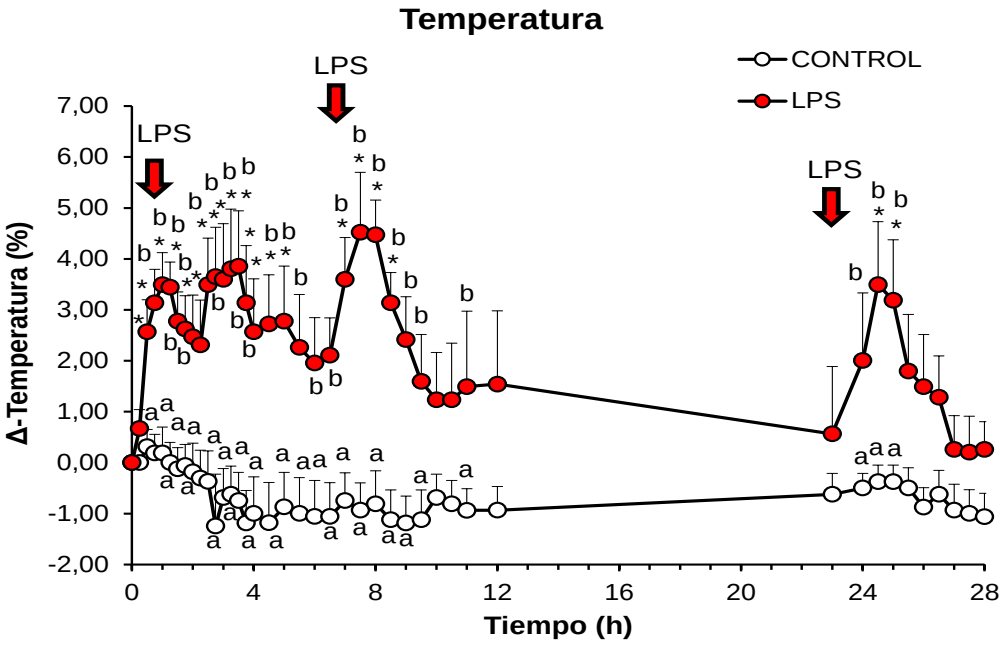

Figura 26. Cambios en la temperatura rectal expresados como porcentaje de diferencia del valor basal (T0), en ovinos control y ovinos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli*. *: Diferencias significativas respecto a valor basal (p < 0,05). Letras minúsculas diferentes en sentido vertical (a, b) indican diferencias significativas entre grupos (p < 0,05). Valores representan promedios ± error estándar medio, para n=5. Flechas indican tiempo de administración de cada inyección de LPS. Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 27 se observan las concentraciones de interleuquina- 6 (IL-6) evaluadas en los ovinos del estudio. Las mayores concentraciones de esta citoquina se observaron en los animales tratados con LPS en comparación a los valores observados en el grupo control. Se determinó una tendencia a presentarse diferencias estadísticamente

significativas para el factor tratamiento (p=0,078), sin embargo, para el factor tiempo las diferencias no fueron estadísticamente significativas (p > 0,05).

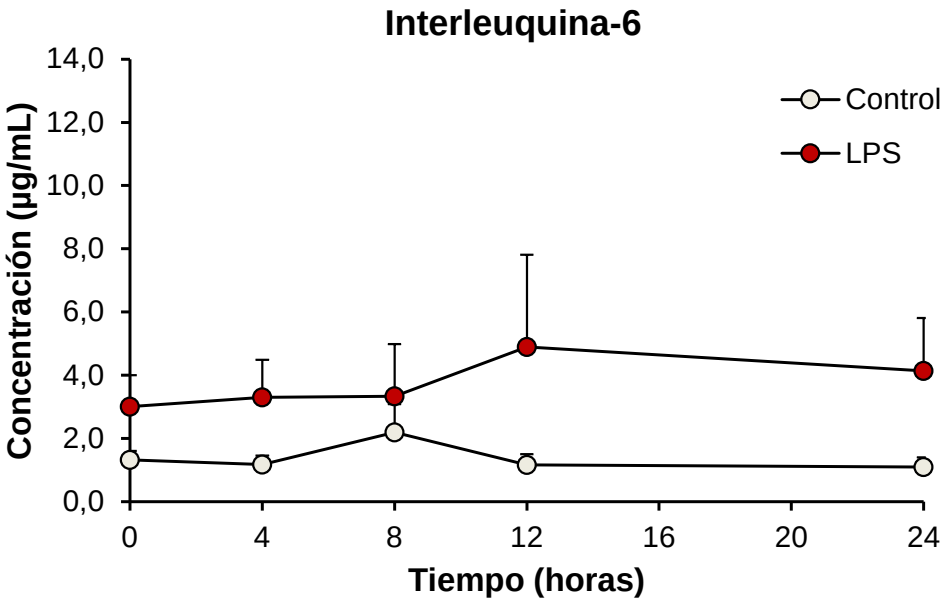

Figura 27: Concentraciones de Interleuquina-6 en ovinos control y ovinos tratados con LPS de *E. coli*. Valores indican promedios ± error estándar medio para n=5. Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 28 se presentan los promedios de concentraciones de PCR, obtenidas en los ovinos del grupo control y del grupo tratado con LPS. Se observó un incremento de las concentraciones séricas de PCR en los ovinos tratados con LPS respecto de los promedios observados en los ovinos del grupo control. De acuerdo con el análisis de varianza, se observó una tendencia a presentar diferencias significativas para el factor tratamiento entre ambos grupos experimentales (p= 0,0845). No se determinaron diferencias significativas respecto a los niveles basales (T0) para el grupo control y tratado con LPS (p > 0,05).

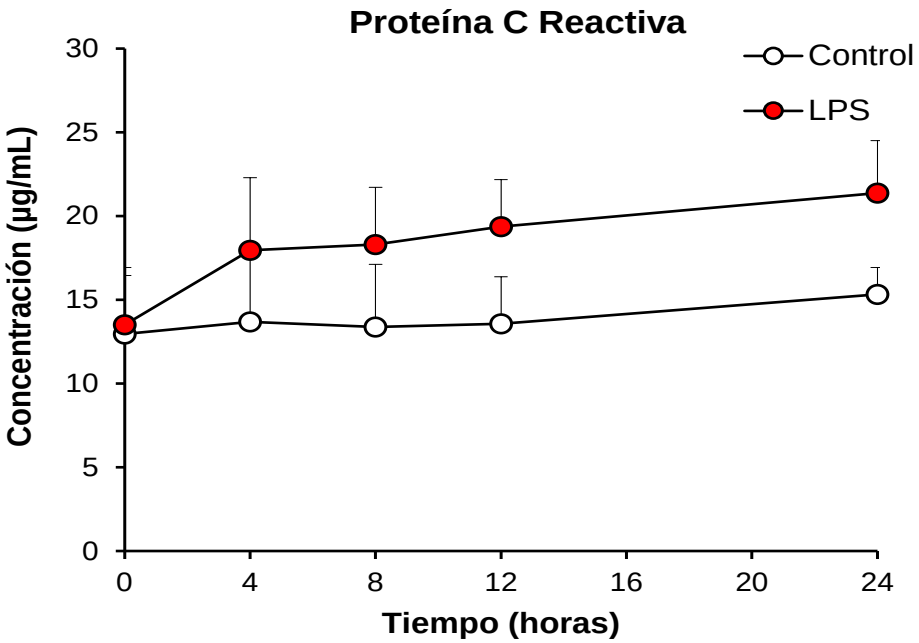

Figura 28: Concentraciones de proteína C reactiva en ovinos control y ovinos tratados con LPS de *E. coli*. Valores indican promedios ± error estándar medio para n=5. Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 15 se presentan los resultados de medición de las variables hematológicas obtenidas en ovinos del grupo control y en ovinos del grupo tratado con LPS de *E. coli*. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ovinos del grupo control y ovinos tratados con LPS en el recuento de leucocitos totales, asociadas con una disminución significativa de los recuentos de linfocitos y monocitos en los animales del grupo tratado con LPS ($p < 0,05$). También se observó una disminución significativa del recuento de neutrófilos entre las 4 h y 12 h posteriores a la administración de LPS en los ovinos del grupo experimental respecto a los promedios del grupo control. A las 24 h de muestreo el recuento de neutrófilos alcanza valores superiores al valor basal ($p < 0,05$).

El recuento de eosinófilos no presentó diferencias significativas entre ambos grupos ($p > 0,05$).

Según lo descrito en la Tabla 16 no se observaron diferencias significativas para las variables de volumen globular aglomerado (VGA %) y concentración de hemoglobina entre ambos grupos experimentales ($p > 0,05$). Asimismo, el recuento de plaquetas no mostró diferencias significativas entre ambos grupos ($p > 0,05$). Por otra parte, se observó que en los ovinos tratados con LPS, los promedios de proteínas totales disminuyeron significativamente respecto del grupo control a las 24 h ($p < 0,05$).

Como se presenta en la Tabla 17, la actividad de las enzimas hepáticas AST y GGT, no presentó diferencias significativas entre ambos grupos experimentales ($p > 0,05$), sin embargo, a las 24 h se observó un aumento significativo de la actividad enzimática de AST en los ovinos tratados con LPS respecto de los valores basales ($p < 0,05$).

Las concentraciones de creatinina aumentaron significativamente desde las 8 h a 24 h en el grupo tratado con LPS respecto del grupo control, y se observó un incremento significativo respecto a los valores basales en el grupo tratado con LPS entre las 4 h y 24 h. Los valores de concentraciones de urea aumentaron significativamente ($p < 0,05$) en los animales endotoxémicos a las 24 h, respecto de los promedios del grupo control, como se muestra en la Tabla 17.

Tabla 15. Promedios de recuento total y diferencial de leucocitos obtenidos en ovinos control y ovinos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli*.

	GRUPO CONTROL						GRUPO TRATADO CON LPS					
	Tiempo (h)						Tiempo (h)					
Parámetro	**0**	**1**	**4**	**8**	**12**	**24**	**0**	**1**	**4**	**8**	**12**	**24**
Leucocitos Totales *(N°/µL)*	8342 ± 874 a	8071± 1988 a	10671 ± 1641 a	11228 ± 993 a	11271 ± 887 a	9142 ± 1145 a	6871 ± 1049 a	4042 ± 590 a	2371 ± 343 b *	4942 ± 698 b	3700 ± 611 b	9414 ± 1536 a
Linfocitos *(N°/µL)*	4558 ± 349 a	5535 ± 1271 a	4994 ± 889 a	5382 ± 620 a	6118 ± 360 a	5390 ± 729 a	4070 ± 762 a	2873 ± 540 b	1666 ± 233 b*	2308 ± 253 b	1861 ± 125 b*	3788 ± 878 a
Monocitos *(N°/µL)*	386,9 ± 82,8 a	329,3 ± 98,1 a	288,7 ± 75,9 a	377,3 ± 71,0 a	367,4 ± 97,0 a	302,0 ± 42,6 a	250,1 ± 62,0 a	124,4 ± 27,6 a	78,9 ± 17,4 b*	122,7 ± 23,6 b	132,7 ± 36,1 b	347,9 ± 125,5 a
Neutrófilos *(N°/µL)*	3232 ± 800 a	1995 ± 593 a	5282 ± 1331 a	5436 ± 485 a	4708 ± 866 a	3408 ± 669 a	2470 ± 824 a	730 ± 279 a	622 ± 178 b	2450 ± 637 b	1705 ± 523 b	5241 ± 928 a *
Eosinófilos *(N°/µL)*	165,7 ± 54,2	210,6 ± 164	105,7 ± 75,4	89,3 ± 74,4	75,9 ± 38	42,3 ± 42,3	80,0 ± 30,9	0,0 ± 0,0	3,7 ± 3,7	61,6 ± 49,9	0,0 ± 0,0	36,9 ± 36,9

Valores representan promedios ± EEM para n=5 por grupo. Letras diferentes en sentido horizontal indican diferencias significativas entre grupos. * Diferencias significativas respecto a T0 valor basal ($p < 0,05$). Fuente: Elaboración propia.

Tabla 16. Promedios de VGA, concentración de hemoglobina, recuento de plaquetas y concentración de proteínas totales obtenidos en ovinos control y ovinos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli.*

	GRUPO CONTROL						GRUPO TRATADO CON LPS					
	Tiempo (h)						Tiempo (h)					
Parámetro	**0**	**1**	**4**	**8**	**12**	**24**	**0**	**1**	**4**	**8**	**12**	**24**
VGA (%)	36,6 ± 1,2	31,7 ± 1,2	31,7 ± 0,8	31,6 ± 1,2	30,6 ± 1,8	36,0 ± 1,5	36,1 ± 2,0	35,3 ± 2,2	35,9 ± 2,0	33,1 ± 2,0	35,3 ± 2,2	35,4 ± 1,3
Hemoglobina *(g/dL)*	12,2 ± 0,4	10,6 ± 0,4	10,6 ± 0,3	10,5 ± 0,4	10,2 ± 0,6	12,0 ± 0,5	12,0 ± 0,6	11,8 ± 0,7	11,9 ± 0,7	11,0 ± 0,7	11,8 ± 0,7	11,8 ± 0,4
Plaquetas *(N°/µL)*	247,9 ± 30,9	355,0 ± 57,7	377,7 ± 67,5	287,4 ± 43,3	274,0 ± 27,6	327,4 ± 30,0	309,3 ± 39,6	311,7 ± 44,8	274 ± 44,8	282,6 ± 37,0	245,1 ± 50	322,7 ± 41,4
Proteínas *(g/L)*	71,9 ± 3,3 a	70,9 ± 2,5 a	70,1 ± 2,3 a	74,3 ± 2,2 a	74,6 ± 2,2 a	73,9 ± 2,3 a	70,9 ± 2,3 a	69,6 ± 2,4 a	69,9 ± 2,6 a	66,9 ± 1,1 a	66,4 ± 1,3 a	63,3 ± 3,6 b

VGA: Volumen globular aglomerado. Valores representan promedios ± EEM para n=5 por grupo. Letras diferentes en sentido horizontal indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$). Fuente: Elaboración propia.

Tabla 17. Parámetros bioquímicos sanguíneos obtenidos en ovinos control y ovinos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli*.

	GRUPO CONTROL						GRUPO TRATADO CON LPS					
	Tiempo (h)						Tiempo (h)					
Parámetro	**0**	**1**	**4**	**8**	**12**	**24**	**0**	**1**	**4**	**8**	**12**	**24**
AST *(U/L)*	163,9 ± 40,0	134,4 ± 15,0	128,0 ± 16,8	139,4 ± 13,6	143,3 ± 13,8	149,9 ± 19,7	123,9 ± 11,9	132,7 ± 10,6	146,7 ± 9,6	165,9 ± 17,9	201,7 ± 32,0	231,9 ± 40,9*
GGT *(U/L)*	86,1 ± 14,8	74,7 ± 8,1	77,4 ± 9,4	82,0 ± 8,5	81,6± 8,6	80,4 ± 9,1	72,4 ± 4,8	68,6 ± 5,3	75,4 ± 4,3	74,7 ± 2,9	80,4 ± 5,0	81,7 ± 2,7
Creatinina *(µmol/L)*	73,8 ± 11,1 a	93,7 ± 8,6 a	95,0 ± 9,1 a	89,6 ± 11,1 a	95,4 ± 19,6 a	86,4 ± 10,0 a	83,3 ± 6,5 a	98,1 ± 6,9 a	117,3 ± 6,3 a*	125,0 ± 6,8 b*	130,7 ± 10,1 b*	122,5 ± 8,4 b*
Urea *(mmol/L)*	5,3 ± 0,6 a	3,9 ± 0,5 a	4,6 ± 0,5 a	5,3 ± 0,6 a	5,1 ± 0,5 a	4,2 ± 0,5 a	5,6 ± 0,5 a	4,1 ± 0,5 a	4,8 ± 0,5 a	6,0 ± 0,6 a	6,5 ± 0,6 a	7,8 ± 1,3 b

AST: Aspartato aminotransferasa; GGT: γ-glutamiltransferasa. Valores representan promedios ± EEM para n=5 por grupo. Letras diferentes en sentido horizontal indican diferencias significativas entre grupos. * Diferencias significativas respecto a T0 valor basal * $p < 0,05$. Fuente: Elaboración propia.

2.1.2. Efectos de la respuesta inflamatoria aguda sobre la disposición plasmática de florfenicol y florfenicol amina en ovinos.

2.1.2.1 Efectos de la respuesta inflamatoria aguda sobre la disposición plasmática de florfenicol y florfenicol amina en ovinos posterior a la administración de florfenicol vía intravenosa.

En la Figura 29 se muestran las curvas de concentraciones plasmáticas en el tiempo de FFC en ovinos control y ovinos tratados con LPS de *E. coli.*, posterior a la administración vía IV de una dosis de 20 mg/kg de FFC. Se observa que en ambos grupos experimentales las concentraciones plasmáticas de FFC presentan un patrón similar en la fase inicial de distribución, sin embargo, en la fase de eliminación el curso de las concentraciones sigue patrones diferentes, presentando los ovinos tratados con LPS un declive menos pronunciado de sus concentraciones en el tiempo. En el grupo control se observaron concentraciones plasmáticas promedio de FFC de 48,56 ± 3,18 µg/mL a las 0,05 h posteriores a la administración del antibiótico. En el grupo tratado con LPS las concentraciones plasmáticas de FFC fueron más elevadas que en el grupo control, siendo estas diferencias significativas a las 8 y 10 h ($p < 0,05$).

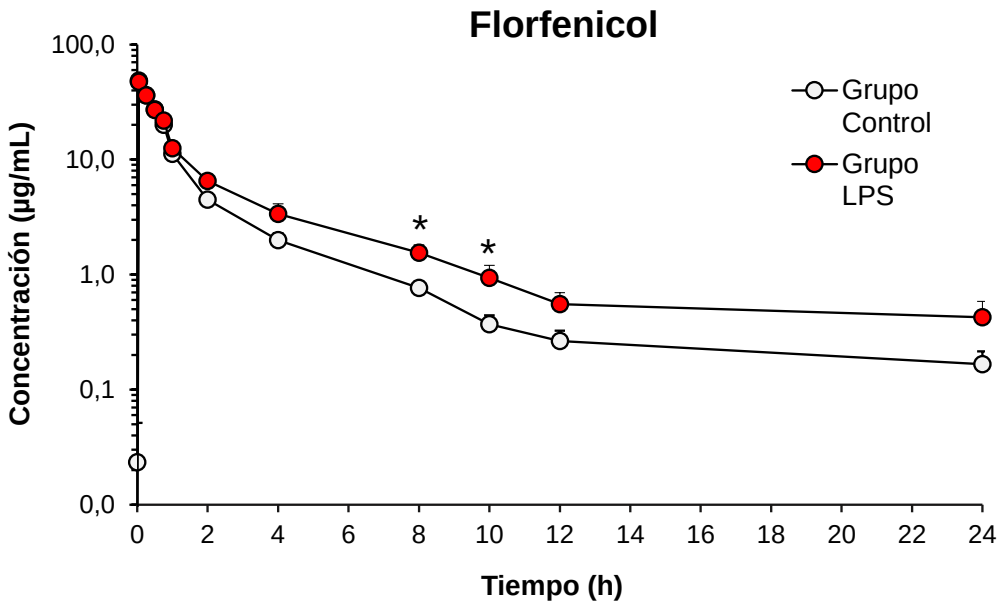

Figura 29. Curvas semilogarítimicas de concentraciones plasmáticas de florfenicol administrado vía intravenosa en ovinos control y ovinos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS) (n=6). Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 18 se describen los parámetros farmacocinéticos de FFC obtenidos luego de la administración IV de una dosis de 20 mg/kg de FFC en ovinos. Se observó que los valores de $AUC_{0-t,}$ y $AUC_{0-\infty}$ presentaron un incremento significativo en los ovinos tratados con LPS, en comparación con los valores observados en los ovinos sanos. Se observó una tendencia en el TMR a presentar valores mayores en los ovinos tratados con LPS (p = 0,077). Por otra parte, el *clearance* presentó una disminución significativa en los ovinos tratados con la endotoxina desde valores de 264,3 ± 12,3 mL*h/kg hasta 208,1 ± 13,7 mL*h/kg.

Tabla 18. Parámetros farmacocinéticos de florfenicol posterior a la administración intravenosa de 20 mg/kg en ovinos control y ovinos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli*.

Parámetro Farmacocinético	Control	LPS	Valor de *p*
K_{el} (1/h)	0,143 ± 0,06	0,090 ± 0,01	0,352
$t_{1/2el}$ (h)	8,0 ± 1,8	9,0 ± 1,9	0,666
AUC_{0-t} (µg* h/mL)	76,5 ± 3,6	91,9 ± 6,2	0,059*
$AUC_{0-\infty}$ (µg* h/mL)	76,5 ± 3,6	98,4 ± 7,1	0,020*
TMR (h)	2,6 ± 0,3	5,8 ± 2,1	0,077
Vd_{ss} (mL)	690 ± 82	1131 ± 365	0,265
CL (mL*h/kg)	264,3 ± 12,3	208,1 ± 13,7	0,012*

Resultados se expresan como promedio ± EEM. *$p \leq 0,05$ vs Control. K_{el}: constante de eliminación; $t_{1/2el}$: vida media de eliminación; AUC_{0-t}: Área bajo la curva concentración vs tiempo desde cero al último tiempo de muestreo; $AUC_{0-\infty}$: Área bajo la curva concentración vs tiempo desde cero al infinito. TMR: tiempo medio de residencia; Vd_{ss}: volumen de distribución en estado estacionario; CL: *Clearance* (n=6). Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 30 se presentan los promedios correspondientes a las concentraciones plasmáticas en el tiempo del metabolito FFC-a, obtenidos para ovinos control y tratados con LPS de *E. coli,* posterior a la inyección vía IV de una dosis de 20 mg/kg de FFC. Se puede observar que ambos grupos experimentales presentaron un patrón de concentraciones similar, en el cual las concentraciones de FFC-a fueron detectables hasta las 24 h de muestreo. En los ovinos tratados con LPS los valores promedio máximos del metabolito fueron de 0,65 ± 0,07 µg/mL, a diferencia de lo observado en el grupo control donde alcanzaron un máximo de 0,60 ± 0,06 µg/mL, 1 h posterior a la administración de FFC.

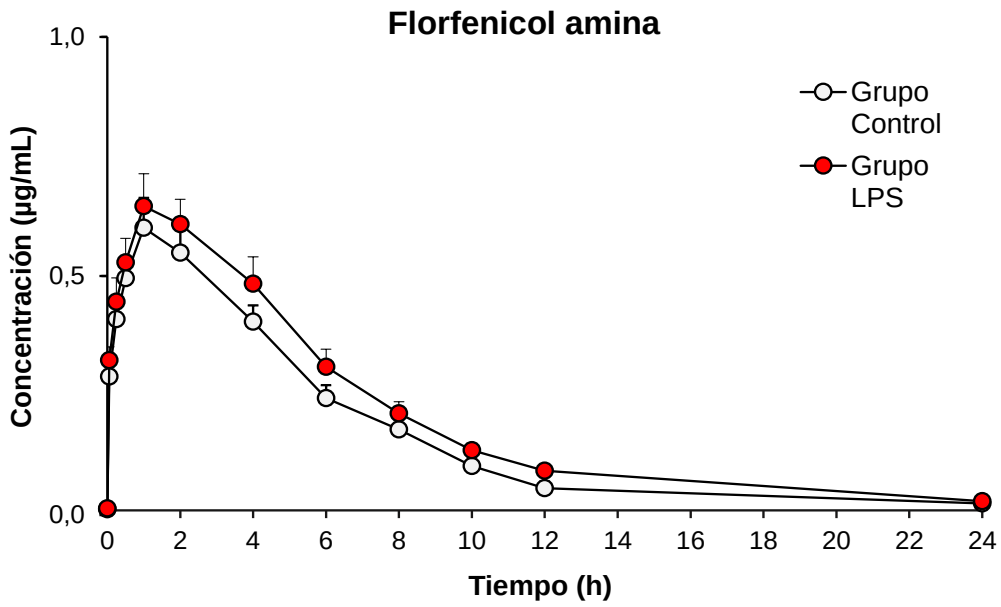

Figura 30. Curvas de concentraciones plasmáticas de florfenicol amina posterior a la administración de FFC vía IV en ovinos control y ovinos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS) (n=5). Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 19 se presentan los parámetros farmacocinéticos del metabolito FFC-a obtenidos luego de la administración vía IV de FFC en dosis de 20 mg/kg en ovinos. No se observaron diferencias significativas para los parámetros de FFC-a entre ambos grupos experimentales ($p > 0,05$).

Tabla 19. Parámetros farmacocinéticos de florfenicol amina posterior a la administración intravenosa de 20 mg/kg de florfenicol en ovinos tratados con solución salina (control) y ovinos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli.*

Parámetro Farmacocinético	Control	LPS	Valor de *p*
$C_{máx}$ (µg/mL)	0,67 ± 0,08	0,67 ± 0,06	1,000
$T_{máx}$ (h)	1,5 ± 0,22	1,3 ± 0,21	0,599
K_{el} (1/h)	0,13 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,830
$t_{1/2el}$ (h)	6,05 ± 0,78	6,26 ± 0,86	0,864
AUC_{0-t} (µg* h/mL)	4,0 ± 0,4	4,9 ± 0,4	0,183
$AUC_{0-\infty}$ (µg* h/mL)	4,2 ± 0,5	5,1 ± 0,4	0,186
TMR (h)	6,7 ± 0,7	7,6 ± 0,8	0,405
MR %	5,63 ± 0,79	5,36 ± 0,57	0,781

Resultados se expresan como promedio ± EEM. *$p \leq 0,05$ vs Control. $C_{máx}$: concentración máxima; $T_{máx}$: Tiempo en alcanzar $C_{máx}$; K_{el}: constante de eliminación; $t_{1/2el}$: vida media de eliminación; AUC_{0-t}: Área bajo la curva concentración vs tiempo desde cero al último tiempo de muestreo; $AUC_{0-\infty}$: Área bajo la curva concentración vs tiempo desde cero al infinito. TMR: tiempo medio de residencia; MR%: Relación metabolito/FFC en porcentaje (n=6). Fuente: Elaboración propia.

2.1.2.2 Efectos de la respuesta inflamatoria aguda sobre la disposición plasmática de florfenicol y florfenicol amina en ovinos posterior a la administración de florfenicol vía intramuscular.

En la Figura 31 se muestran las curvas de concentraciones plasmáticas en el tiempo de FFC en ovinos control y ovinos tratados con LPS de *E. coli.*, posterior a la administración de una dosis de 20 mg/kg de FFC vía IM. Se observa que en ambos grupos las concentraciones plasmáticas de FFC presentan un patrón de absorción similar, sin embargo, en la fase de distribución las concentraciones en el grupo LPS muestran una

tendencia a ser mayores que en el grupo control, siendo estas diferencias estadísticamente significativas a las 3 h posterior a la administración de FFC ($p < 0,05$).

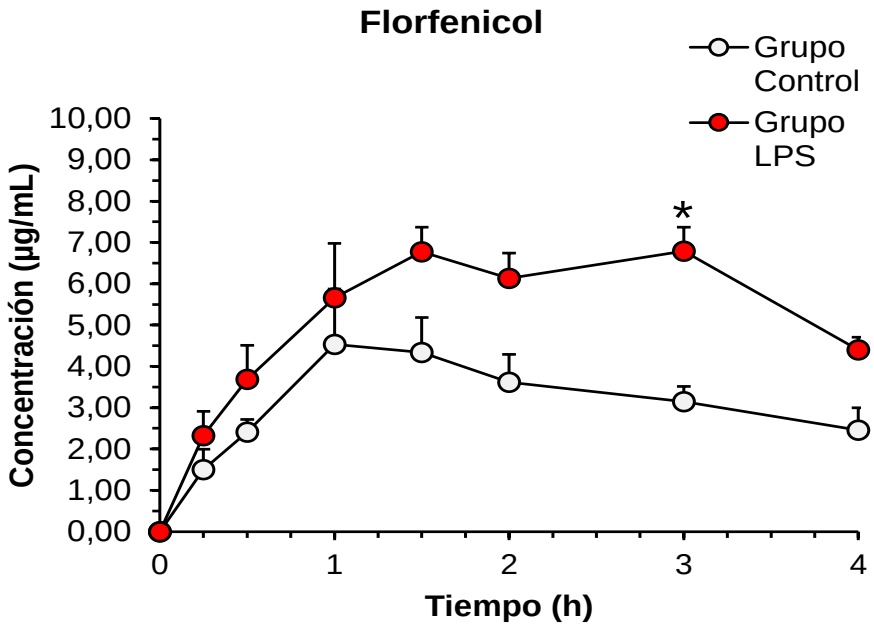

Figura 31. Concentraciones plasmáticas de florfenicol administrado vía intramuscular en ovinos control y ovinos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS). Valores indican promedios ± error estándar medio para n=5. Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 20 se describen los parámetros farmacocinéticos de FFC obtenidos posteriormente a la administración IM de una dosis de 20 mg/kg de FFC en ovinos. Se observó que la RIA inducida por la administración de tres dosis de 1 µg/kg de LPS modificó los parámetros farmacocinéticos de FFC. Los valores de $C_{máx}$ mostraron una tendencia a ser mayores en los ovinos tratados con LPS ($p = 0,075$), al igual que los promedios de vida media de distribución ($p = 0,094$). También el AUC_{0-t} de FFC fue

significativamente mayor en los ovinos del grupo tratado con LPS respecto a los animales del grupo control (p = 0,031) (n=5).

Tabla 20. Parámetros farmacocinéticos de florfenicol posterior a la administración intramuscular de 20 mg/kg en ovinos control y ovinos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli*.

Parámetro Farmacocinético	**Control**	**LPS**	**Valor de *p***
$C_{máx.}$ (µg/mL)	4,98 ± 1,25	7,63 ± 0,74	0,075
$T_{máx.}$ (h)	1,6 ± 0,37	2,1 ± 0,4	0,219
K_{ab} (1/h)	1,17 ± 0,16	1,16 ± 0,29	0,983
$t_{1/2\ ab}$ (h)	0,58 ± 0,16	0,71 ± 0,11	0,406
K_{α} (1/h)	1,08 ± 0,28	1,16 ± 0,41	0,875
$t_{1/2\ \alpha}$ (h)	0,63 ± 0,1	1,38 ± 0,47	0,094
AUC_{0-t} (µg* h/mL)	12,8 ± 2,3	21,8 ± 2,0	0,031*

Resultados se expresan como promedio ± EEM. *$p \leq 0,05$. $C_{Máx}$: concentración máxima; $T_{máx}$: Tiempo en alcanzar $C_{Máx}$; K_{ab}: constante de absorción; $t_{1/2\ ab}$: vida media de absorción; K_{α}: constante de distribución; $t_{1/2\ \alpha}$: vida media de distribución; AUC_{0-t}: Área bajo la curva concentración vs tiempo desde cero a 4h. Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 32 se presentan los promedios correspondientes a las concentraciones plasmáticas en el tiempo del metabolito FFC-a, obtenidos para ovinos control y tratados con LPS de *E. coli,* posterior a la inyección vía IM de una dosis de 20 mg/kg de FFC. En el grupo tratado con LPS las concentraciones de FFC-a tuvieron un incremento continuo en el tiempo, alcanzando valores máximos de 0,22 ± 0,03 µg/mL, a diferencia de lo observado en el grupo control donde alcanzaron un máximo de 0,14 µg/mL a las 2 h y

luego experimentan un descenso leve hasta las 4 h. Las concentraciones del metabolito en los ovinos tratados con LPS presentaron valores significativamente mayores respecto de los ovinos control a las 3 y 4 h posterior a la administración de FFC ($p < 0,05$).

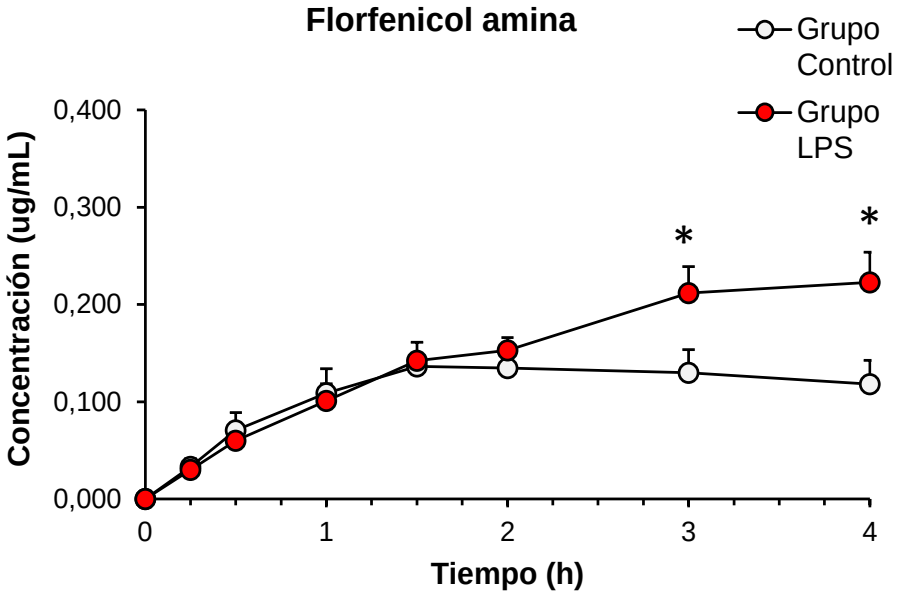

Figura 32. Concentraciones plasmáticas de florfenicol amina posterior a la administración intramuscular de FFC en ovinos control y ovinos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS). Valores indican promedios ± error estándar medio para n=5. Fuente: Elaboración propia.

Los parámetros farmacocinéticos del metabolito FFC-a obtenidos luego de la administración IM de FFC en dosis de 20 mg/kg en ovinos se presentan en la Tabla 21. Se observa que los valores de $C_{máx}$, $T_{máx}$ y AUC_{0-t} fueron significativamente mayores en los ovinos tratados con LPS respecto a los promedios del grupo control. Respecto al tiempo medio de formación del metabolito en plasma no existieron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales ($p > 0,05$). Cabe mencionar que la

proporción porcentual FFC-a/FFC (relación metabolito/fármaco original, expresada por el acrónimo del inglés MR = *metabolite ratio*) fue menor en los ovinos tratados con LPS, sin embargo, esta diferencia no fue significativa (p = 0,215).

Tabla 21. Parámetros farmacocinéticos de florfenicol amina posterior a la administración intramuscular de 20 mg/kg de florfenicol en ovinos tratados con solución salina (control) y tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS).

Parámetro Farmacocinético	**Control**	**LPS**	**Valor de *p***
$C_{máx}$ (µg/mL)	0,17 ± 0,01	0,25 ± 0,03	0,015*
$T_{máx}$ (h)	2,20 ± 0,56	3,40 ± 0,25	0,043*
K_{fm} (1/h)	3,28 ± 0,89	3,31 ± 0,53	0,973
$t_{1/2\ fm}$ (h)	0,26 ± 0,05	0,23 ± 0,03	0,324
K_{α} (1/h)	1,86 ± 0,57	3,04 ± 0,69	0,212
$t_{1/2\ \alpha}$ (h)	0,59 ± 0,38	0,29 ± 0,07	0,417
AUC_{0-t} (µg* h/mL)	0,44 ± 0,02	0,60 ± 0,05	0,017 *
MR (%)	4,0 ± 0,87	2,8 ± 0,17	0,215

Resultados se expresan como promedio ± error estándar de la media. *$p \leq 0,05$. $C_{Máx}$: concentración máxima; $T_{Máx}$: Tiempo en alcanzar $C_{Máx}$; K_{fm}: constante de formación de metabolito; $t_{1/2\ fm}$: vida media de formación del metabolito; K_{α}: constante de distribución; $t_{1/2\ \alpha}$: vida media de distribución; AUC_{0-t}: Área bajo la curva concentración vs tiempo desde cero al último tiempo de muestreo; MR%: Proporción de metabolito en porcentaje (n=5). Fuente: Elaboración propia.

2.2 Objetivo 2B. Determinar el efecto de la respuesta inflamatoria aguda inducida por el lipopolisacárido de *E. coli* sobre la distribución tisular de florfenicol y florfenicol amina, en ovinos.

2.2.1. Efectos de la respuesta inflamatoria aguda sobre la distribución tisular de florfenicol y florfenicol amina en ovinos.

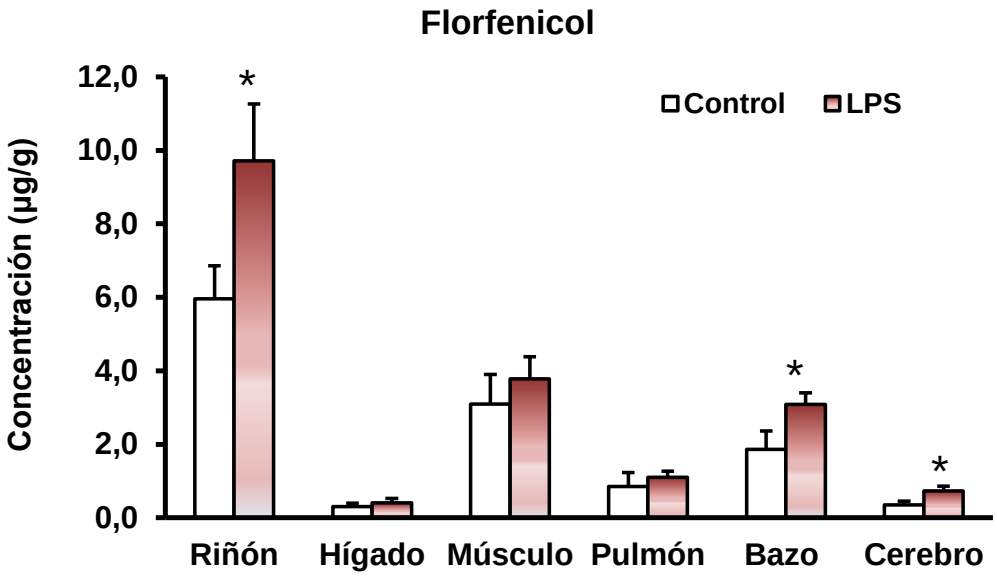

Figura 33. Promedios (± EEM) de concentraciones tisulares de florfenicol administrado vía intramuscular en dosis de 20 mg/kg en ovinos control y ovinos tratados con lipopolisacárido de *E. coli.* * $p \leq 0,05$ (n=5). Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 33 se muestran las concentraciones tisulares obtenidas para FFC en ovinos. En el grupo control las concentraciones más altas se observaron en riñón (5,96 ± 0,89 µg/g), seguidas en orden decreciente por músculo (3,10 ± 0,81 µg/g), bazo (1,86 ± 0,5 µg/g), pulmón (0,85 ± 0,38 µg/g), cerebro (0,35 ± 0,1 µg/g) e hígado (0,30 ± 0,09 µg/g). En los ovinos tratados con LPS, las concentraciones de FFC fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) respecto a los ovinos controles en riñón (9,72 ± 1,41 µg/g), bazo (3,09 ± 0,29 µg/g) y cerebro (0,73 ± 0,12 µg/g).

En la Figura 34 se muestran los promedios para la relación tejido/plasma de FFC en ovinos. No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales.

Los resultados indican que las concentraciones tisulares de FFC en el caso de riñón son aproximadamente 2 veces mayores que las concentraciones plasmáticas.

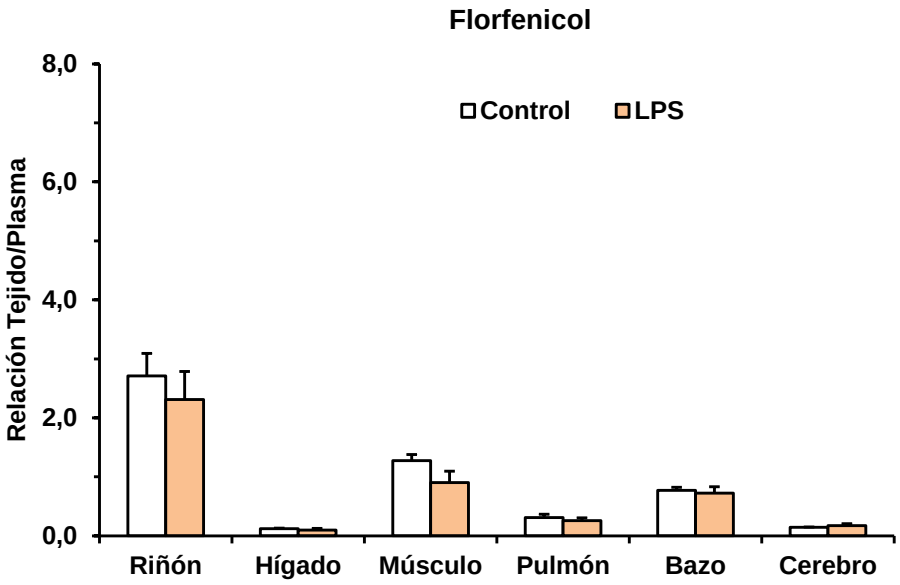

Figura 34. Promedios (± EEM) de relación tejido/plasma de florfenicol en ovinos control y ovinos tratados con lipopolisacárido de *E. coli*. (n=5). Fuente: Elaboración propia.

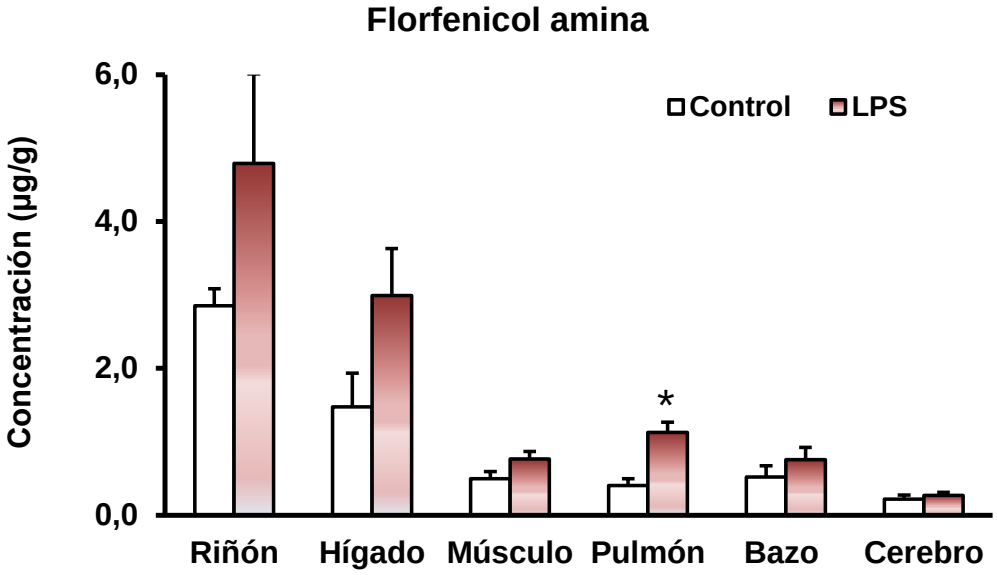

Figura 35. Promedios (± EEM) de concentraciones tisulares de florfenicol amina posterior a la administración vía intramuscular de una dosis de 20 mg/kg de florfenicol en ovinos control y ovinos tratados con lipopolisacárido de *E. coli*. * $p \leq 0,05$ (n=5). Fuente: Elaboración propia.

Las concentraciones tisulares de FFC-a se presentan en la Figura 35. En los ovinos del grupo control las mayores concentraciones se obtuvieron en riñones (2,83 ± 0,23 µg/g), seguido en forma decreciente por hígado (1,48 ± 0,46 µg/g), bazo (0,52 ± 0,50 µg/g), músculo (0,50 ± 0,1 µg/g), pulmón (0,41 ± 0,10 µg/g), y cerebro (0,22 ± 0,10 µg/g). En el grupo tratado con LPS las concentraciones tisulares de FFC-a mostraron una tendencia a ser significativamente más altas en riñones (4,79 ± 1,47 µg/g; $p = 0,089$), seguido por hígado (2,99 ± 0,71 µg/g; $p = 0,0652$) y músculo (0,76 ± 0,11 µg/g; $p = 0,067$); mientras que en pulmón fueron significativamente mayores que en el grupo control (1,13 ± 0,18 µg/g; $p = 0,0087$).

La relación Tejido/Plasma para FFC-a en los ovinos control y ovinos tratados con LPS de *E. coli* se presenta en la Figura 36; se observa que las concentraciones tisulares de FFC-a en riñón del grupo control fueron más de 30 veces superiores que las concentraciones plasmáticas del metabolito. Mientras que en hígado las concentraciones tisulares de FFC-a en el grupo control fueron alrededor de 20 veces superiores a las concentraciones plasmáticas. Al comparar los promedios de relación tejido/plasma entre ambos grupos experimentales no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

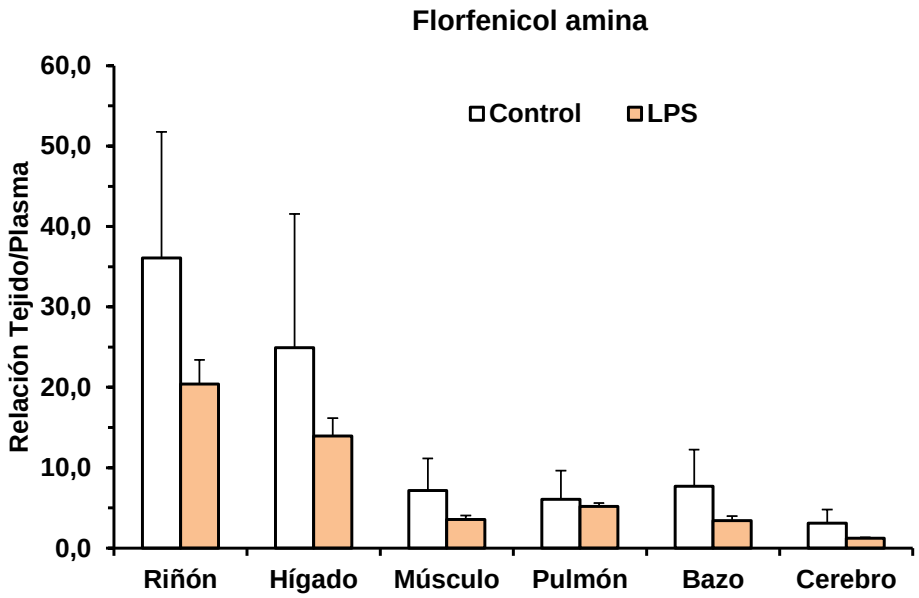

Figura 36. Promedios (± EEM) de relación tejido/plasma de florfenicol amina en ovinos control y ovinos tratados con lipopolisacárido de *E. coli*, posterior a la administración de una dosis de 20 mg/kg de florfenicol, (n=5). Fuente: Elaboración propia.

3. **Objetivo 3. Comparar la disposición plasmática y distribución tisular de florfenicol y florfenicol amina, entre conejos y ovinos, posterior a la administración de florfenicol en animales sanos.**

Para determinar diferencias de especie se analizaron las curvas de concentraciones plasmáticas y parámetros farmacocinéticos de FFC y FFC-a obtenidos posterior a la administración intravenosa (IV) de FFC en ovinos y conejos control.

En la Figura 37 se muestran las curvas de concentraciones plasmáticas en el tiempo de FFC obtenidas en ovinos y conejos. En conejos se observó un rápido descenso de los niveles plasmáticos de FFC con una persistencia de los niveles sanguíneos detectables hasta 8 h. En cambio, en ovinos las concentraciones de FFC se mantuvieron por mayor tiempo. Las concentraciones plasmáticas de FFC en conejos fueron significativamente inferiores a las observadas en ovinos ($p < 0.05$) entre las 0,05 h y 1 h posterior a la administración de FFC vía IV.

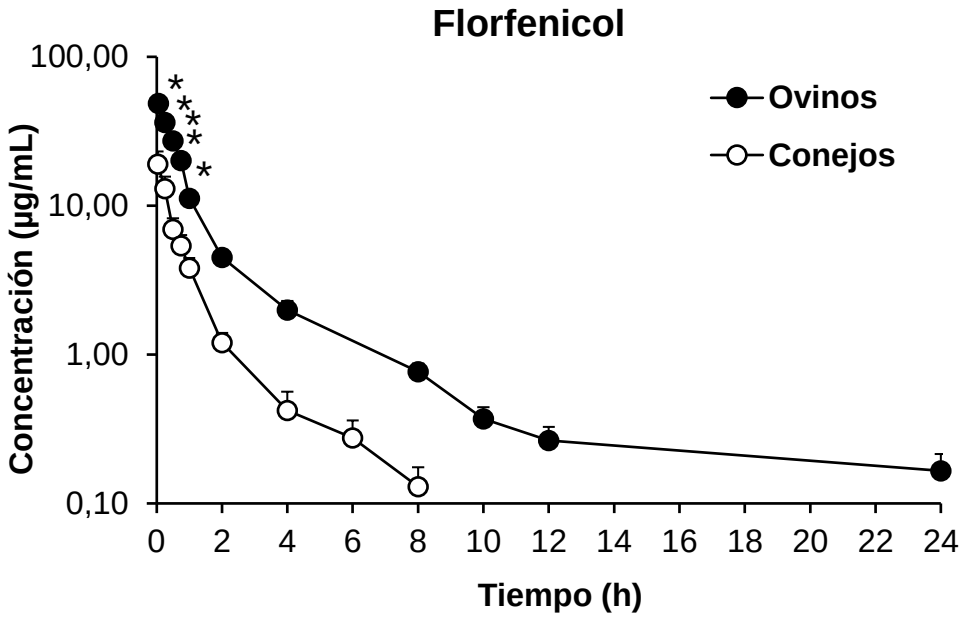

Figura 37. Curvas de concentraciones plasmáticas en el tiempo de florfenicol administrado por vía intravenosa en dosis de 20 mg/kg en ovinos (n=6) y conejos (n=6) control. Cada punto representa el promedio ± EEM. *: Significancia $p < 0,05$. Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 22 se muestran los promedios de parámetros farmacocinéticos de FFC posterior a la administración intravenosa de una dosis de 20 mg/kg, en ovinos y conejos control. En los ovinos, los promedios de área bajo la curva (AUC_{0-t} y $AUC_{0-\infty}$), la vida media de eliminación y el tiempo medio de residencia de FFC fueron significativamente mayores a los promedios obtenidos en conejos ($p < 0,05$). En cambio, los promedios de *clearance* y volumen de distribución del antibiótico en conejos fueron significativamente mayores a los observados en ovinos ($p < 0,05$).

Tabla 22. Parámetros farmacocinéticos de florfenicol administrado vía intravenosa en dosis de 20 mg/kg en ovinos y conejos control.

Parámetro Farmacocinético	**Ovinos**	**Conejos**	**Valor de *p***
AUC_{0-t} (µg* h/mL)	76,5 ± 3,6	16,8 ± 1,2	0,0001*
$AUC_{0-\infty}$ (µg* h/mL)	76,5 ± 3,6	17,2 ± 0,9	0,0001*
$T_{1/2el}$ (h)	8,0 ± 1,8	3,4 ± 0,5	0,0321*
TMR (h)	2,6 ± 0,3	1,1 ± 0,2	0,001*
Vd_{ss} (mL)	690 ± 82	1412 ± 234,5	0,019*
Cl (mL/h)	264,3 ± 12,3	1228,2 ± 107,5	0,0001*

Resultados se expresan como promedio de porcentajes ± EEM. * $p \leq 0,05$. AUC_{0-t}: Área bajo la curva concentración vs tiempo desde cero al último tiempo de muestreo; $AUC_{0-\infty}$: Área bajo la curva concentración vs tiempo desde cero al infinito. $T_{1/2el}$: vida media de eliminación; TMR: tiempo medio de residencia; $Vd_{ss:}$ volumen de distribución en estado estacionario; Cl: *Clearance* total; (n=6). Fuente: Elaboración propia.

Las curvas de concentraciones plasmáticas en el tiempo para el metabolito FFC-a en ovinos y conejos se presentan en la Figura 38. Las concentraciones plasmáticas del metabolito FFC-a fueron significativamente superiores en los conejos respecto de los ovinos entre las 0,05 h y 2 h posterior a la administración de FFC vía IV ($p < 0,05$).

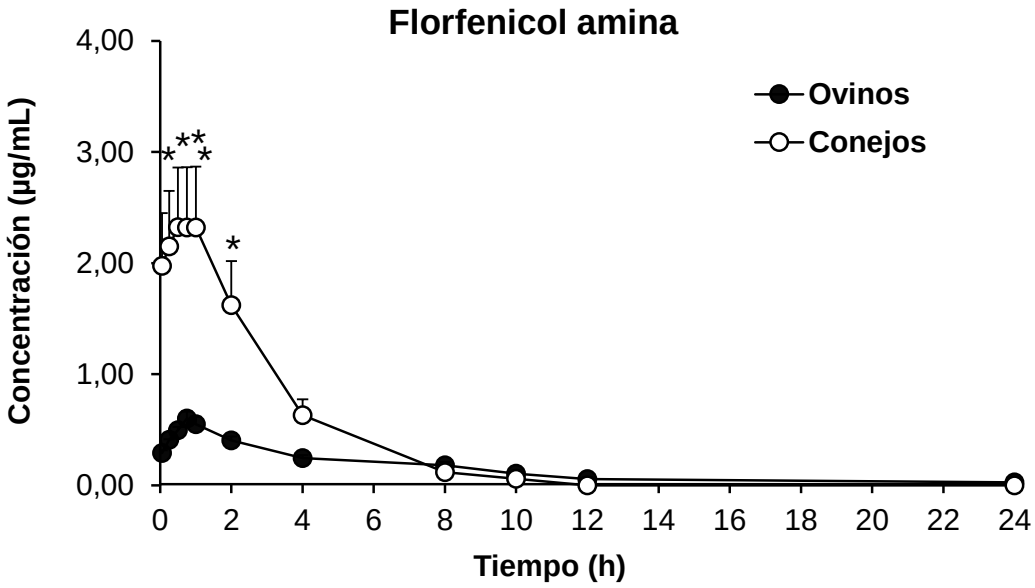

Figura 38. Curvas de concentración plasmática en el tiempo de florfenicol amina posterior a la administración de 20 mg/kg de florfenicol vía intravenosa en ovinos y conejos control. Cada punto representa el promedio ± EEM. *: Significancia $p < 0,05$. Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 23 se muestran los promedios de parámetros farmacocinéticos de FFC-a posterior a la administración endovenosa de FFC en ovinos y conejos. Se determinaron diferencias significativas para la comparación de todos los parámetros farmacocinéticos de FFC-a entre ambas especies en estudio ($p < 0,05$). Los promedios de $C_{máx}$ y área bajo la curva fueron significativamente más altos en conejos que en ovinos. En cambio, la vida media de eliminación y tiempo medio de residencia de FFC-a fueron significativamente más elevados en ovinos. La proporción de metabolito (relación AUC-FFC-a/AUC-FFC) fue significativamente mayor en conejos.

Tabla 23. Parámetros farmacocinéticos de florfenicol amina en ovinos y conejos control tratados con 20 mg/kg de FFC via intravenosa.

Parámetro Farmacocinético	**Ovinos**	**Conejos**	**Valor de *p***
$C_{máx}$ (µg/mL)	0,67 ± 0,08	2,85 ± 0,34	0,0022*
AUC_{0-t} (µg* h/mL)	4,0 ± 0,4	9,68 ± 1,14	0,0009*
$AUC_{0-\infty}$ (µg* h/mL)	4,2 ± 0,5	9,68 ± 1,14	0,0014*
$t_{1/2el}$ (h)	6,05 ± 0,78	1,61 ± 0,11	0,0022*
TMR (h)	6,7 ± 0,7	2,56 ± 0,23	0,0050*
MR (%)	5,63 ± 0,79	57,6 ± 7,5	0,0001*

Resultados se expresan como promedio de porcentajes ± EEM. * $p \leq 0,05$. $C_{máx}$: concentración máxima; AUC_{0-t}: Área bajo la curva concentración vs tiempo desde cero al último tiempo de muestreo; $AUC_{0-\infty}$: Área bajo la curva concentración vs tiempo desde cero al infinito; $t_{1/2el}$: vida media de eliminación; TMR: tiempo medio de residencia; MR%: Relación metabolito/FFC en porcentaje, (n=6). Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 39 se comparan las concentraciones tisulares de FFC en ovinos y conejos control obtenidas a las 4 h posterior a la administración de FFC. En ambas especies las concentraciones más altas del antibiótico se observaron en riñón. En conejos las concentraciones del antibiótico fueron significativamente mayores respecto a los ovinos en las muestras de hígado, pulmón, bazo y cerebro ($p \leq 0,05$).

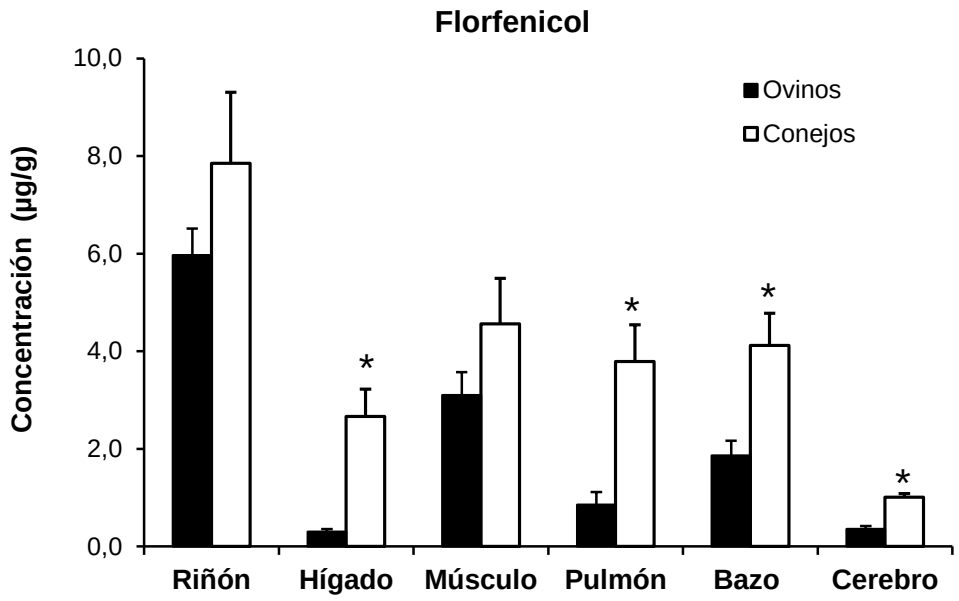

Figura 39. Promedios (± EEM) de concentraciones tisulares de florfenicol posterior a la administración de 20 mg/kg vía intramuscular en ovinos (n=5) y conejos (n=6) control. *: Significancia $p \leq 0,05$. Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 40 se comparan las concentraciones tisulares de FFC-a en ovinos y conejos control. En ambas especies las mayores concentraciones de FFC-a se localizaron en el riñón. En todos los tejidos analizados se observaron concentraciones significativamente mayores del metabolito ($p < 0.05$) en los conejos.

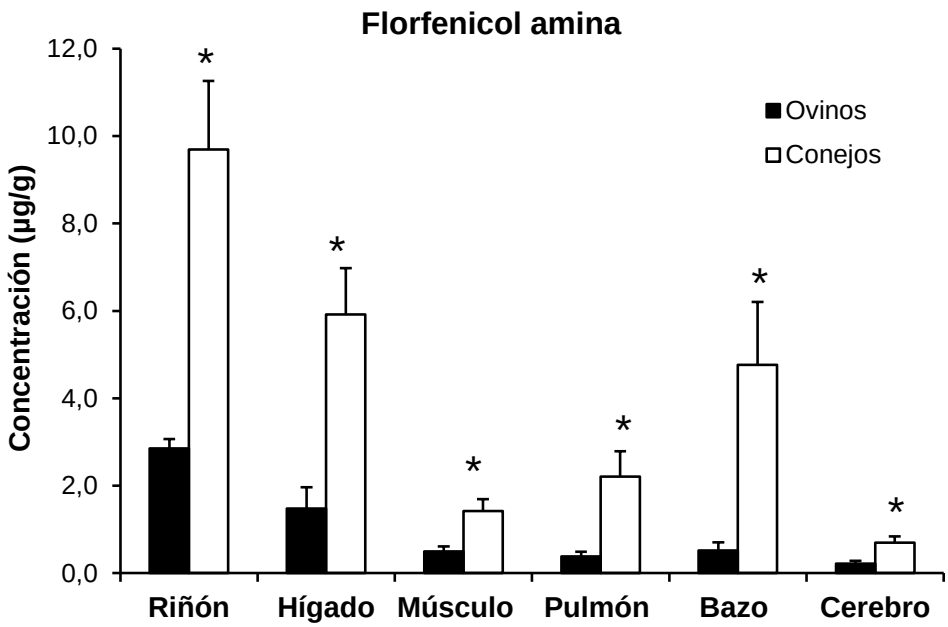

Figura 40. Comparación de los promedios (± EEM) de concentraciones tisulares de florfenicol amina posterior a la administración de 20 mg/kg de florfenicol vía intramuscular en ovinos (n=5) y conejos (n=6) control. *: Significancia $p \leq 0,05$. Fuente: Elaboración propia

Comparación Relación Tejido/plasma entre ovinos y conejos

Respecto a la comparación de los valores de relación tejido/plasma para FFC, se encontraron valores significativamente superiores en las muestras de hígado, pulmón, bazo y cerebro de conejos en comparación con los valores de ovinos (Tabla 24).

Tabla 24. Valores de cuociente para la relación de concentraciones tejido/plasma de florfenicol posterior a la administración de 20 mg/kg de florfenicol vía intramuscular en conejos y ovinos sanos.

Relación tejido/plasma FFC			
Tejido	Ovinos	Conejos	Valor de *p*
Riñón	2,71 ± 0,38	2,52 ± 0,29	0,691
Hígado	0,12 ± 0,01	0,86 ± 0,15	0,002*
Músculo	1,28 ± 0,10	1,64 ± 0,30	0,082
Pulmón	0,31 ± 0,05	1,22 ± 0,17	0,002*
Bazo	0,77 ± 0,05	1,32 ± 0,09	0,0006*
Cerebro	0,14 ± 0,00	0,35 ± 0,04	0,0019*

Resultados se expresan como promedios ± EEM. Valores corresponde a cuocientes de relación tejido/plasma. *$p \leq 0,05$, n=5 para ovinos, n=6 para conejos. Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 25 se muestra la comparación de valores de relación tejido/plasma para FFC-a calculadas para ambas especies. A la comparación estadística, no se encontraron diferencias significativas en los promedios de esta variable entre ambas especies.

Tabla 25. Valores de cuociente para la relación de concentraciones tejido/plasma de florfenicol amina posterior a la administración de 20 mg/kg de florfenicol vía intramuscular en conejos y ovinos sanos.

Relación tejido/plasma FFC-a			
Tejido	Ovinos	Conejos	Valor de *p*
Riñón	36,09 ± 15,68	12,66 ± 1,74	0,099
Hígado	24,92 ± 16,65	7,88 ± 1,37	0,235
Músculo	7,15 ± 4,01	1,82 ± 0,24	0,135
Pulmón	6,07 ± 3,57	2,65 ± 0,36	0,266
Bazo	7,70 ± 4,54	5,25 ± 0,52	0,523
Cerebro	3,11 ± 1,70	0,87 ± 0,09	0,131

Resultados se expresan como promedios ± EEM. *$p \leq 0,05$, n=5 para ovinos, n=6 para conejos. Fuente: Elaboración propia.

4. **Objetivo 4. Determinar si existen diferencias de especie en los cambios de disposición plasmática de florfenicol y florfenicol amina inducidos por la administración del lipopolisacárido de *E. coli*, en conejos y ovinos.**

En la Figura 41 se presentan las curvas de concentraciones plasmáticas en el tiempo de FFC obtenidas en conejos y ovinos tratados con LPS. Se observó que las concentraciones plasmáticas de FFC en los ovinos fueron mayores que las de los conejos, y en la fase de eliminación se observa mayor persistencia de las

concentraciones en el tiempo, en el caso de los ovinos. Mientras que en los conejos las concentraciones de FFC decaen de manera más pronunciada en el tiempo. Las concentraciones de FFC en ovinos fueron significativamente más elevadas que en conejos a las 0,05 h y 0,5 h posteriores a la administración de FFC (p <0,05).

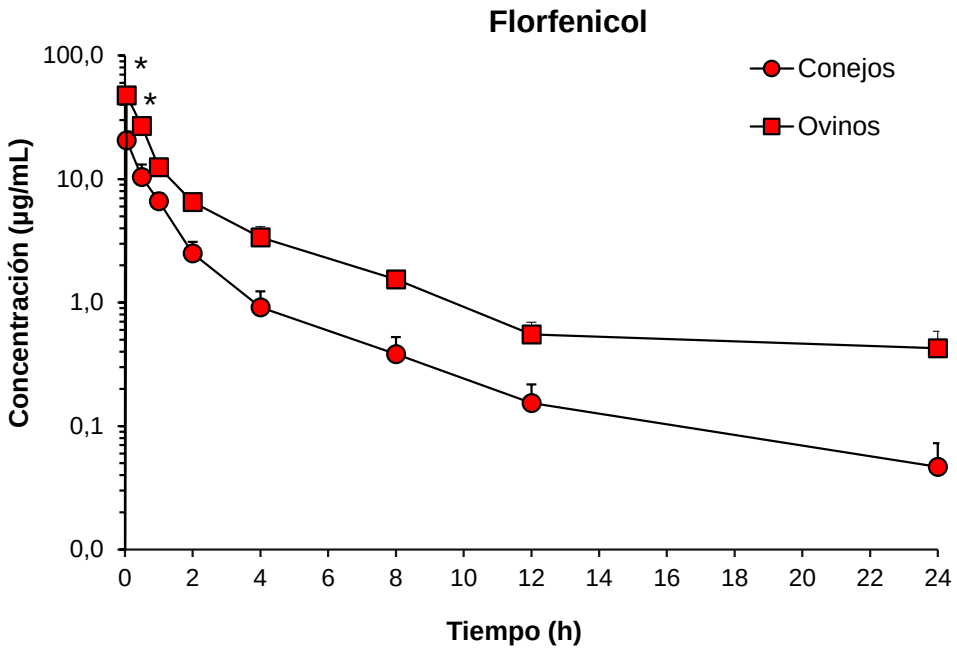

Figura 41. Concentraciones plasmáticas de florfenicol posterior a la administración de una dosis de 20 mg/kg vía IV en ovinos y conejos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS) (n=5). Fuente: Elaboración propia.

Para evaluar si existen diferencias entre ambas especies animales en estudio, respecto a los cambios sobre la farmacocinética de FFC y FFC-a inducidos por la RIA, en cada especie se calculó para cada parámetro farmacocinético el porcentaje que representa la diferencia entre el valor del grupo tratado con LPS respecto del valor del grupo control, según la siguiente fórmula:

Porcentaje de cambio (Δ%) = ((Valor LPS – Valor Control) /Valor Control) x100

Respecto a los resultados obtenidos al comparar los deltas de los parámetros farmacocinéticos de FFC entre ambas especies no se obtuvieron diferencias significativas para los parámetros estudiados ($p > 0,05$), como se observa en la Tabla 26.

Tabla 26. Promedios de porcentaje de cambio respecto del valor del grupo control (Δ%) de parámetros farmacocinéticos de florfenicol posterior a la administración intravenosa de 20 mg/kg en conejos y ovinos tratados con solución salina (control) y tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli.*

Porcentaje de cambio (Δ%)			
Parámetro Farmacocinético	Ovinos	Conejos	Valor de *p*
ΔAUC_{0-t} (%)	23,0 ± 13,9	52,9 ± 12,8	0,1443
$\Delta AUC_{0-\infty}$ (%)	31,0 ± 13,8	52,3 ± 11,3	0,3095
$\Delta t_{1/2el}$ (%)	47,9 ± 38,9	71,2 ± 28,3	0,6390
ΔTMR (%)	117,4 ± 71,8	211,9 ± 99,1	0,4848
ΔVd_{ss} (%)	72,0 ± 59	114,6 ± 78,6	1,000
ΔCl (%)	-20,1 ± 6,9	-34,2 ± 6,1	0,2403

Resultados se expresan como promedio de porcentajes ± EEM. Delta corresponde a porcentaje de cambio del valor LPS respecto del valor control. AUC_{0-t}: Área bajo la curva concentración vs tiempo desde cero al último tiempo de muestreo; $AUC_{0-\infty}$: Área bajo la curva concentración vs tiempo desde cero al infinito; $t_{1/2el}$: vida media de eliminación; TMR: tiempo medio de residencia; $Vd_{ss:}$ volumen de distribución en estado estacionario; Cl: *Clearance* total; (n=6). Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 42 se presentan las curvas de concentraciones plasmáticas en el tiempo de FFC-a obtenidas posterior a la administración vía IV de una dosis de FFC de 20 mg/kg en conejos y ovinos tratados con LPS. Se observó que las concentraciones plasmáticas

de FFC-a siguieron un patrón similar en ambas especies sin existir diferencias significativas entre ambas curvas de concentraciones plasmáticas.

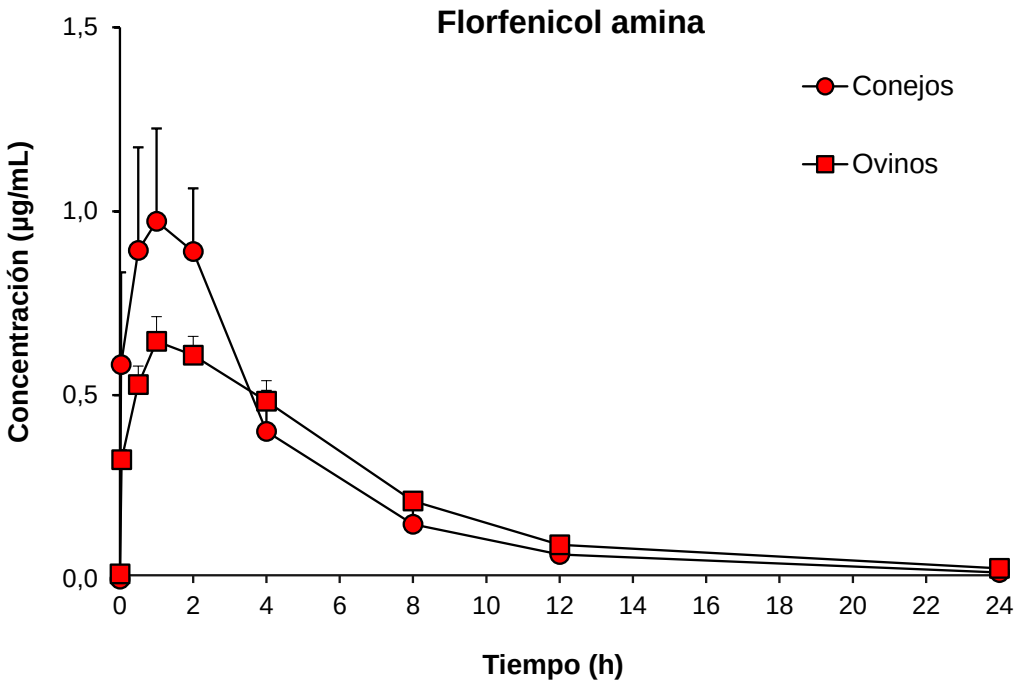

Figura 42. Concentraciones plasmáticas de florfenicol amina posterior a la administración de FFC vía IV en conejos y ovinos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS) (n=5). Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 27 se muestran los resultados de porcentaje de cambio para los parámetros farmacocinéticos de FFC-a y la comparación entre ambas especies experimentales. Se obtuvieron diferencias significativas para los parámetros $C_{máx,}$ AUC_{0-t} y $AUC_{0-\infty}$, en los cuales se observó que los porcentajes de cambio observados en los conejos eran significativamente menores respecto a los observados en ovinos ($p < 0,05$).

Para el parámetro de $\Delta C_{Máx}$ (%), en los conejos, esta variable disminuyó desde 2,85 en el grupo control a 1,10 µg/mL en el grupo LPS, lo que representa una disminución de 59,5 % en los conejos. Para $\Delta AUC_{0\text{-}t}$ (%), los valores disminuyeron desde 9,68 µg* h/mL en los conejos control, a 5,17 µg* h/mL en los conejos tratados con LPS. En los ovinos, a diferencia de los conejos no se observaron cambios en estos parámetros entre los animales control y tratados con LPS.

En el caso del delta de la relación de metabolito/FFC (MR%), esta experimentó una disminución significativa en los conejos respecto de los ovinos (p = 0,0104), y se observó un valor menor de MR% de FFC-a en los conejos tratados con LPS en comparación con los conejos controles.

Tabla 27. Promedios de porcentaje de cambio respecto del valor control (Δ%) de parámetros farmacocinéticos de florfenicol amina posterior a la administración intravenosa de florfenicol en dosis de 20 mg/kg en conejos y ovinos tratados con solución salina (control) y tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli.*

Porcentaje de cambio (Δ%)			
Parámetro Farmacocinético	Ovinos	Conejos	Valor de *p*
$\Delta C_{máx}$ (%)	3,3 ± 11,1	-59,5 ± 8,6	0,001*
ΔAUC_{0-t} (%)	30,0 ± 21,6	-46,7 ± 10,6	0,0097*
$\Delta AUC_{0-\infty}$ (%)	30,7 ± 21,2	-45,6 ± 10,9	0,0043*
$\Delta t_{1/2el}$ (%)	15,3 ± 22,2	116,2 ± 65,6	0,1755
ΔTMR (%)	19,6 ± 16,7	76,2 ± 40,3	0,2235
ΔMR (%)	4,24 ± 17,97	-62,42 ± 5,81	0,0104*

Resultados se expresan como promedio de porcentajes ± EEM. Delta corresponde a porcentaje de cambio del valor LPS respecto del valor control. * $p \leq 0,05$. $C_{máx}$: concentración máxima; AUC_{0-t}: Área bajo la curva concentración vs tiempo desde cero al último tiempo de muestreo; $AUC_{0-\infty}$: Área bajo la curva concentración vs tiempo desde cero al infinito; $t_{1/2el}$: vida media de eliminación; TMR: tiempo medio de residencia; MR%: Relación metabolito/FFC en porcentaje, (n=6). Fuente: Elaboración propia.

DISCUSIÓN
ESTUDIOS EN CONEJOS

VII. DISCUSIÓN.

1. Discusión resultados obtenidos en conejos.

Evaluación de los efectos del lipopolisacárido de *E. coli* como inductor de respuesta inflamatoria aguda en conejos.

El modelo experimental que reproduce una RIA en animales mediante la administración de LPS de *E. coli* ha sido aplicado en diversas investigaciones, y es frecuentemente utilizado para el estudio de procesos fisiológicos y neuroendocrinos que caracterizan el proceso febril (Saitoh *et al.,* 1999; Elmas *et al.,* 2006; Roth y Blatteis, 2014). Es un modelo reproducible que permite replicar lo que ocurre naturalmente en condiciones de un proceso infeccioso e inflamatorio (Post *et al.,* 2003; Firmino *et al.,* 2018), y en consecuencia evaluar su influencia sobre la farmacocinética y disposición de fármacos (Plessers *et al.,* 2015, Wyns *et al.,* 2015).

El LPS corresponde a una endotoxina presente en la membrana externa de las bacterias gran negativas, que actúa como potente inductor del sistema inmune, activando el proceso inflamatorio y con ello la síntesis de diversas citoquinas proinflamatorias (Aderem y Ulevitch, 2000; Cavaillon, 2018). El LPS, de uso experimental, es un compuesto puro y estable, que puede ser almacenado en forma liofilizada (Poli-de-Figueiredo *et al.,* 2008) y ser administrado en forma de soluciones, y en dosis variables. Por mencionar algunos estudios, se han reportado administración de dosis bajas que fluctúan desde 0,01 µg/kg hasta 1 µg/kg en bovinos (Jacobsen *et al.,* 2005). También se han utilizado dosis un poco más elevadas de 2 µg/kg en cerdos (Post *et al.,* 2003), o de 2,5 µg/kg en bovinos (Carroll *et al.*, 2009), hasta dosis de más de 10 µg/kg, como en el estudio de Elmas *et al.* (2006), quienes administraron una dosis de LPS de 100 µg/kg en

conejos para generar una endotoxemia generalizada con choque séptico en los animales.

El modelo de inflamación aguda inducida por LPS ha sido replicado extensamente en distintas especies animales como ratones (Gridley *et al.,* 2007, Huh *et al.,* 2013), ratas (Nicholson y Renton, 2001; Goralski *et al.,* 2003), conejos (Saitoh *et al.,* 1999; Elmas *et al.,* 2006; Elmas *et al.,* 2008; Huang et al., 2008; Koc *et al.,* 2015) y cerdos (Monshouwer *et al.,* 1996; Post *et al.,* 2003; Wyns *et al.,* 2015). También se ha aplicado en rumiantes como cabras (Van Miert *et al.,* 1988, Van Miert *et al.,* 1997; Rao *et al.,* 2000; Salvesen *et al.,* 2016), ovinos (Kabaroff *et al*., 2006; Yates *et al.,* 2011; Hadfield *et al.*, 2018) y bovinos (Kumar y Malik, 2003; Jacobsen *et al.,* 2005; Carroll *et al.,* 2009; Plessers *et al*., 2016). Además, este modelo se ha estudiado en primates no humanos, como Cercopiteco verde (*Cercopitecus aethiops)* (De Blois y Horlick, 2001) y Mono Rhesus (*Macaca Mulatta*) (Willete *et al.,* 2007), y también en seres humanos (Shedlofsky *et al.,* 1994; Poloyac *et al.,* 1999; Starkie *et al.,* 2003; Kiers *et al.,* 2017).

La administración de LPS induce una respuesta inflamatoria aguda en el organismo caracterizada por la activación inmediata del sistema inmune innato, donde ejercen un rol determinante el sistema del complemento, y los receptores *tipo Toll* (TLR; de *toll like receptors*). En la vía de activación del complemento se ha evidenciado que la administración de LPS genera rápidamente la síntesis del componente C5a en ratones, siendo este componente fundamental para la generación de la respuesta febril inducida por LPS (Blatteis *et al.,* 2004; Boackle *et al*., 2005; Roth y Blatteis, 2014). El componente C5a actúa como quimiotáctico para neutrófilos, monocitos y otros leucocitos. Activa monocitos induciendo la liberación de IL-6 (Gross y Andus, 1992) e incrementa la

liberación de TNF e IL-1 desde monocitos y macrófagos (Cavaillon *et al.,* 1990). El componente C5a también induce liberación de prostaglandina E_2 (PGE_2) desde células de Kupffer (Pestel *et al.,* 2002; Blatteis, 2006).

Otra acción fundamental del LPS es producir activación de células mononucleares fagocíticas, como monocitos y macrófagos, a través de la unión del LPS a los receptores TLR-4, que desencadena la síntesis y liberación de citoquinas proinflamatorias tales como: TNF-α, IL-1β e IL-6, además de interferones (Dinarello *et al.*, 1999; Kabaroff *et al.,* 2006; Mc Carthy *et al.,* 2017; Prajitha *et al.,* 2018). En la Figura 43 se observan las vías de transducción de señales inducidas por LPS que generan la respuesta inflamatoria aguda. El LPS es reconocido por los receptores TLR4 y por los co-receptores MD2 y CD14, una vez formado el complejo, las vías de señalización pueden ser dependientes de MyD88, o dependientes de TRIF. La vía dependiente de la proteína adaptadora MyD88 recluta a IRAK4 (kinasa 4 asociada a receptor de interleuquina 1), IRAK1 (kinasa 1 asociada a receptor de interleuquina 1), y TRAF6 (factor 6 asociado a receptor de TNF). La fosforilación de IRAK 1 y ubiquitinación de TRAF6 lleva a la activación de NF-kB. El NF-kB activado se transloca al núcleo donde promueve la transcripción de citoquinas proinflamatorias. En la vía dependiente de TRIF, esta molécula recluta a TRAF6 y TRAF3 (factor 3 asociado a receptor de TNF). La señalización mediante TRAF6 lleva a la activación de NF-kB, mientras que la vía de transducción a través de TRAF3 activa a IRF3 (factor 3 regulador de interferón). IRF3 activado transloca al núcleo donde induce la transcripción de interferones tipo I (Mc Carthy *et al.,* 2017). Las citoquinas proinflamatorias liberadas como TNF-α e IL-1β estimulan a su vez una cascada inflamatoria con liberación de otras citoquinas como IL-

6, quimioquinas y eicosanoides. Este proceso también puede desencadenar la liberación de especies reactivas del oxígeno y óxido nítrico causando estrés oxidativo (Morgan, 2008).

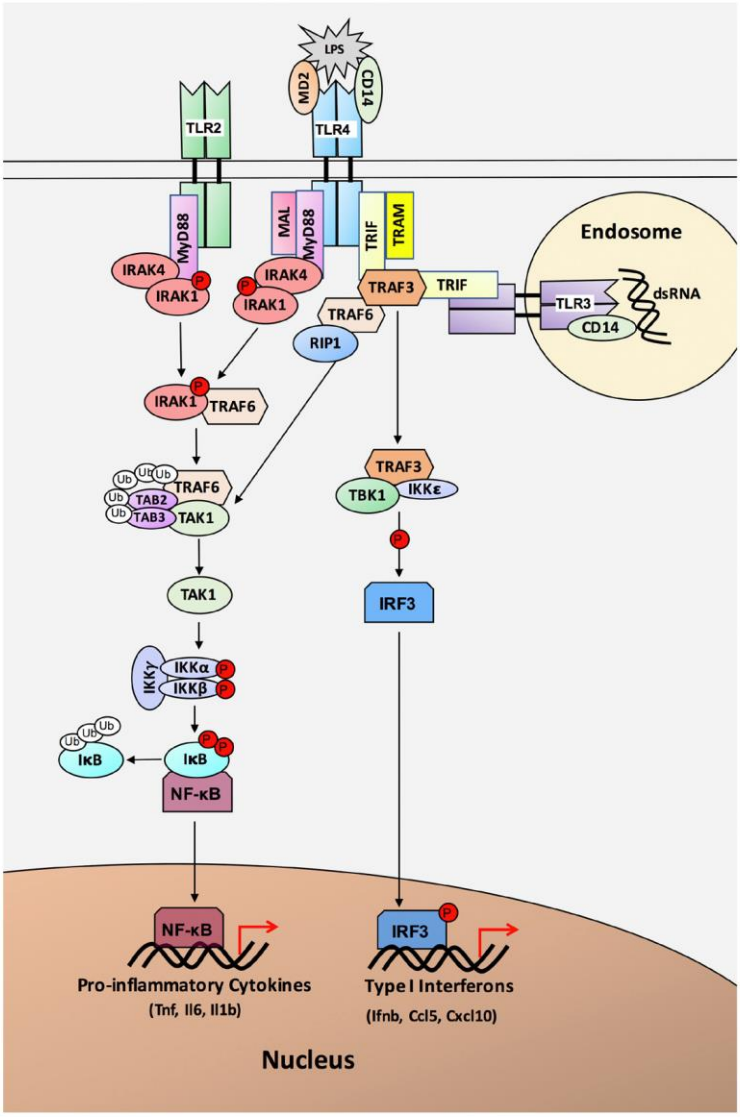

Figura 43. Vías de señalización inducidas por la acción del Lipopolisacárido (LPS), desencadenantes del proceso inflamatorio. Fuente: Extraído de Mc Carthy *et al.* (2017).

El proceso febril es considerado un componente de la respuesta inflamatoria aguda generada en el organismo frente a la infección o inflamación (Roth, 2006). En la Figura 44 se ilustra la vía clásica de los mecanismos participantes en el desarrollo del proceso febril. Se puede observar que en respuesta al ingreso al organismo de un agente pirógeno exógeno como el LPS bacteriano, en el torrente sanguíneo el LPS activa monocitos y macrófagos y estos producen y liberan citoquinas pirógenas, llamadas también pirógenos endógenos tales como IL-1, IL-6 y TNF. A su vez, las citoquinas estimulan el reclutamiento de macrófagos, linfocitos y neutrófilos, los que inducen la liberación adicional de citoquinas pirógenas (Saper *et al.,* 2013; Roth y Blatteis, 2014). El LPS es transportado hacia el hígado donde activa las células de Kupffer, estas células producen citoquinas, como TNF-α, IL-1, IL-6, además de PGE_2 en respuesta al sistema del complemento, y ambas moléculas son transportadas hacia el área preóptica anterior del hipotálamo (POA) donde las citoquinas inducen la expresión de COX-2, y, por lo tanto, se incrementa la síntesis de PGE_2. La PGE_2 inhibe la actividad de neuronas sensibles al calor, resultando en la conservación del calor (Blatteis, 2006; Roth y Blatteis, 2014). Las citoquinas liberadas en circulación también inducen la liberación de PGE_2 en el órgano vasculoso de la lámina terminal (OVLT), que media la elevación de la temperatura en el centro termorregulador del hipotálamo (Netea *et al.,* 2000; Blatteis, 2006). Desde el OVLT se transmiten señales neuronales que causan aumento de la temperatura corporal (TC), desde la sangre hacia el cerebro. Las citoquinas pirógenas liberadas por acción de LPS causan la síntesis de PG dentro del OVLT, el que activa a su vez a neuronas adyacentes. De esta manera, las señales neuronales son conducidas

al centro termorregulador en el área preóptica del hipotálamo anterior, que se encuentra próximo al OVLT, generando incremento de la TC (Lin y Lin, 1996).

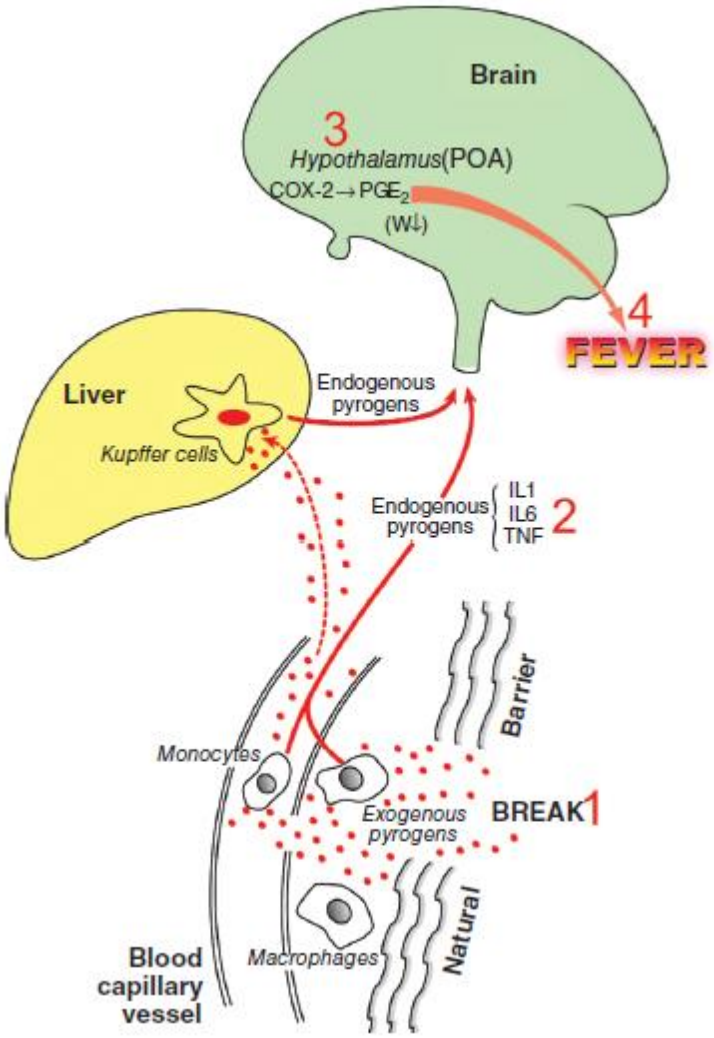

Figura 44. Esquema descriptivo del mecanismo clásico de inducción del proceso febril. Fuente: Extraído de Roth y Blatteis, 2014.

En el presente estudio, la administración IV de tres dosis bajas de LPS de *E. coli* O128:B12 permitió reproducir un estado inflamatorio agudo en los animales, asemejando las condiciones a una infección de baja intensidad que permitió estudiar su efecto sobre la farmacocinética y distribución tisular del antimicrobiano florfenicol (FFC) y su metabolito florfenicol amina (FFC-a) en dos modelos animales.

La administración de la endotoxina bacteriana en conejos generó un estado febril en los animales que se evidenció por un incremento significativo de la TC posterior al tratamiento con LPS, al comparar con la TC de los animales del grupo control. El aumento más pronunciado de temperatura se produjo 1,25 h posterior a la primera inyección de LPS, con un alza de 1,6 °C respecto de la temperatura basal de 38,8 °C, mientras que respecto a la TC del grupo control de 39,2°C, para este mismo tiempo, el aumento fue de 1,2°C. Resultados similares fueron obtenidos por Marca *et al.* (2009) en conejos, donde se observó un incremento significativo de la TC a los 90 minutos posterior a la administración de 2 µg/kg de LPS de *E. coli*. Otros estudios en conejos han reportado alza de la TC posterior a la administración de LPS; Elmas y colaboradores en el año 2006 generaron un modelo de endotoxemia en conejos mediante la inyección IV de una dosis de 100 µg/kg de LPS de *E. coli* O111:B4, reportando un alza en la TC de 1,5-2°C en comparación con los conejos control. Se ha descrito que la administración de LPS en dosis relativamente altas genera comúnmente un patrón febril de tipo bifásico (Romanovsky y Blatteis, 1995; Roth, 2006; Roth y Blatteis, 2014), donde el primer incremento de temperatura es causado por la liberación de prostaglandinas (PGE_2) y el segundo incremento de temperatura se atribuye a la liberación de citoquinas proinflamatorias (Romanovsky and Blatteis, 1995; Roth, 2006; Roth and Blatteis, 2014).

En el estudio de Tsai *et al*. (2006) se observó una respuesta febril bifásica con la administración de LPS en dosis de 2 y 10 µg/kg en conejos, observándose TC máximas a los 80 y 200 minutos posterior a la inyección vía IV de LPS. Por otro lado, Dinarello *et al.* (1999) reportaron en conejos que la administración de una dosis baja de LPS de 3 ng/kg vía IV genera una fiebre de tipo monofásica.

En el presente estudio, el patrón de temperatura observado en los conejos posterior a la primera inyección de LPS no coincide con un patrón bifásico propiamente tal, sin embargo, está descrito que en dosis de 1 µg/kg, similares a la utilizada en el presente experimento puede generarse un patrón que puede ser de tipo monofásico (Romanovsky y Blatteis, 1995; Romanovsky *et al.,*1998), y que en dosis mayores o iguales a 2 µg/kg puede observarse un patrón de tipo bifásico (Romanovsky *et al.,*1998). Por lo cual la dosis de 2 µg/kg que fue administrada a los conejos del presente estudio puede generar un patrón tanto monofásico como bifásico de TC. Luego de la segunda inyección de LPS en los conejos de este estudio, no se observó un incremento significativo de la TC, lo cual pudiera ocurrir debido a tolerancia al LPS, que se ha observado luego de la administración repetida de inyecciones de 1 µg/kg de la endotoxina, como fue demostrado por Kumar y Malik (2003) en terneros. También se ha descrito tolerancia a LPS en conejos por Yamashiro *et al.* (1993), quienes describen la reducción en el incremento de la TC, posterior a la segunda administración IV de 5 µg/kg de LPS. Posterior a la tercera inyección de LPS en los conejos del presente estudio, se observó un patrón de temperatura de tipo bifásico el cual pudiera estar causado por la liberación posterior masiva de citoquinas pirógenas (Roth y Blatteis, 2014).

En el presente estudio se observó un incremento significativo de las concentraciones plasmáticas de IL-6 en los conejos del grupo tratado con LPS respecto de los conejos control. Este aumento se mantuvo entre 4 y 12 h posterior a la administración de LPS. Como ha sido expuesto anteriormente, IL-6 es un importante mediador inductor de la fiebre (Dinarello *et al.,* 1999; Walter *et al.,* 2016) y también cumple función en la mantención del proceso febril en conejos (Huang *et al.,* 2008). Sumado a esto, estudios en ratones *knockout* para IL-6 han demostrado que estos animales no desarrollan cuadro febril al ser inyectados sistémicamente con LPS o IL-1 (Chai *et al.,* 1996).

Los niveles máximos de IL-6 de 18,8 pg/mL observados en los conejos tratados con LPS son inferiores a los descritos en el estudio de Saitoh *et al.* (1999) y Saitoh *et al.* (2000) quienes evaluaron las concentraciones de IL-6 en conejos tratados con 17 µg/kg de LPS a intervalos repetidos por 5 dosis, y en conejos tratados con 50 µg/kg, respectivamente. En dichos estudios se obtuvieron valores máximos de IL-6 de alrededor de 350 pg/mL (Saitoh *et al.* 1999) y de 170 pg/mL (Saitoh *et al.* 2000) en los conejos tratados con LPS. No obstante, las dosis de LPS utilizadas fueron más elevadas a la dosis de LPS utilizada en el presente estudio, lo que se condice con los mayores valores de concentraciones de IL-6 observados por dichos autores. Asimismo, en otro estudio de nuestro grupo de investigación se reportaron concentraciones de IL-6 en conejos de 78,09 pg/mL tras la administración de una dosis de LPS de 5 µg/kg (Cazanga *et al.,* 2023), lo cual entrega antecedente de relación proporcional entre las concentraciones de IL-6 con la dosis de LPS administrada.

En este estudio se midieron también las concentraciones de PCR en los animales para determinar los cambios producidos por la administración de LPS de *E. coli*. Durante la

inflamación y la infección la PCR se caracteriza por poseer funciones microbicidas y fagocíticas, y sus concentraciones se incrementan en respuesta a la liberación de citoquinas proinflamatorias (Ebersole y Cappelli, 2000). Los valores de PCR en los conejos del grupo control fluctuaron entre 67,8 y 80,9 µg/mL, resultados que son similares a los descritos por Yu *et al.* (2014) en conejos, que se encontraron en el rango entre 60 y 80 µg/mL. En los conejos del presente estudio, se observó que la RIA inducida por LPS causó un incremento significativo de las concentraciones de PCR a las 24 h de administrada la endotoxina. Este incremento de la PCR más tardío que el aumento de IL-6 coincide con lo descrito para una respuesta inflamatoria inducida por LPS, donde inicialmente se produce la liberación de citoquinas proinflamatorias y en consecuencia a la liberación de estas, se induce la síntesis de proteínas de fase aguda de la inflamación como la PCR (Ebersolle y Capelli, 2000; Cray *et al*., 2009). Resultados similares han sido descritos por Saitoh *et al.* (1999) quienes determinaron aumentos significativos de los niveles de PCR en conejos tratados con cinco inyecciones repetidas de LPS de 17 µg/kg cada una hora por lo cual los niveles de PCR se mantuvieron elevados por un período de 3 días.

Respecto a los cambios hematológicos y de la bioquímica sanguínea observados durante la RIA en los conejos del presente estudio, se observó una disminución significativa en el recuento de leucocitos totales que estuvo determinada por la reducción marcada en el recuento diferencial de linfocitos, monocitos y neutrófilos, entre 1 y 4 h luego de la primera administración de LPS. Estos resultados se pueden explicar por la implicancia de mecanismos de agregación y adherencia de granulocitos y monocitos hacia células endoteliales, que son mediados por la liberación de citoquinas (Chandler

et al., 2022). También se describe que puede producirse el secuestro de neutrófilos desde la circulación general hacia la microcirculación pulmonar (Haslett *et al*., 1987). En otros estudios realizados en conejos, se han observado descensos en los recuentos de leucocitos posterior a la administración de LPS de *E. coli.* Tal es el caso del estudio de Yamashiro *et al.* (1993), en el cual se observó una disminución significativa en los recuentos de leucocitos entre las 2 y 4 h posterior a la inyección de LPS de *Salmonella typhosa.*

El recuento de plaquetas experimentó disminución significativa a las 12 h en los conejos tratados con LPS, en comparación con los conejos del grupo control. Estos resultados coinciden con la ocurrencia de trombocitopenia en ratones posterior a la inyección de LPS y pueden explicarse por los procesos propios de la respuesta inflamatoria aguda, donde las plaquetas pueden agregarse en respuesta al efecto de la endotoxina; también puede activarse el sistema de coagulación, causando secuestro de plaquetas en el lecho capilar de órganos como hígado y bazo (Zhang *et al*., 2009; Rossaint *et al.,* 2018).

Respecto a la actividad de las enzimas indicadoras de daño hepático; AST y GGT, en los conejos tratados con LPS se observaron incrementos significativos de ambas enzimas a las 12 h posteriores a la administración de la endotoxina. Estos cambios se explican por el efecto de los mediadores inflamatorios que se liberan durante la RIA, los cuales pueden producir alteraciones de la funcionalidad hepática. Estos resultados son concordantes con los obtenidos por Cazanga *et al.* (2023) en estudio del presente grupo de investigación donde se observó un alza significativa de actividad de AST en conejos a las 6 y 12 h posterior a la inyección de 5 µg/kg de LPS, junto con un leve incremento de GGT. En conejos, está descrito que, si bien AST no es específica únicamente de

hígado, su actividad se correlaciona directamente con daño hepático (Melillo, 2007; Jenkins, 2008). Respecto a GGT el incremento de esta enzima en conejos es indicadora de lesiones obstructivas en ductos biliares (Melillo, 2007). Elmas *et al.* (2006), observaron en conejos endotoxémicos un aumento pronunciado en la actividad de la enzima AST y ALT, posterior a la administración de una dosis de 100 µg/kg de LPS de *E. coli* O111:B4, mientras que GGT no presentó cambios significativos en comparación a los conejos control.

En los conejos tratados con LPS se observaron incrementos significativos en los niveles de glucosa a las 4 h en comparación a los conejos control, resultados que concuerdan con los reportados por Giri *et al.* (1990), quienes describen la presencia de hiperglicemia en vacas gestantes posterior a la administración de LPS de *E coli,* junto con aumento en los niveles plasmáticos de cortisol. La hiperglicemia puede deberse a la estimulación de la gluconeogénesis en respuesta a niveles elevados de glucocorticoides (Giri *et al.,* 1990). Dicho proceso figura entre los cambios fisiológicos y metabólicos que ocurren en la RIA (Ebersole y Cappelli, 2000; Sugita *et al.,* 2002). Los niveles plasmáticos de glucocorticoides como cortisol pueden elevarse debido a la activación del eje hipotálamo hipófisis adrenal que ocurre en la RIA, los que actúan como hormonas antiinflamatorias para regular la respuesta inflamatoria sistémica inducida por LPS (Kabaroff *et al.,* 2006). Dichos autores reportaron incremento de niveles de cortisol en ovejas tratadas con LPS, con un máximo de concentraciones a las 3 h posterior a la administración de la endotoxina. Asimismo, Marca *et al.* (2009), en conejos tratados con 2 µg/kg de LPS observaron incrementos significativos en los niveles de cortisol. Además, en los animales tratados con LPS se puede producir disminución de la respuesta a la insulina (Sugita *et*

al., 2002; Aleman y Guerrero, 2018), lo cual contribuye al incremento de los niveles de glucosa en sangre.

En los conejos del presente estudio se observó un descenso significativo de las proteínas totales a las 4 h posterior a la administración de LPS, respecto al grupo control. Esta disminución puede atribuirse a la disminución en los niveles de albúmina que fue observada en los conejos tratados con la endotoxina. Resultados similares han sido descritos por Elmas *et al.* (2008) en conejos endotoxémicos, quienes observaron un leve descenso en las proteínas totales, en comparación a los conejos control, sin embargo, estas diferencias no fueron significativas.

La disminución de los niveles de albúmina en los conejos del presente estudio fue observada a las 4 y 24 h posteriores a la administración de LPS. La albúmina representa a la principal proteína de fase aguda de tipo negativa, y sus niveles pueden disminuir por pérdidas específicas debidas a alteraciones renales o gastrointestinales, o por una reducción en su síntesis hepática (Cray *et al.,* 2009).

Respecto a los marcadores de funcionalidad renal como las concentraciones de urea y creatinina, no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos experimentales del presente estudio. Distintos son los resultados descritos por Róka *et al.* (2019), quienes estudiaron los niveles de urea en ratones con falla renal aguda posterior a la inducción de sepsis mediante inyección de LPS bacteriano. La administración de una dosis de 40 mg/kg de LPS vía intraperitoneal en los roedores causó un incremento significativo de los niveles de urea a las 6 h, y con una dosis de LPS de 10 mg/kg se observó aumento significativo de los niveles plasmáticos de urea a

las 24 h para luego disminuir a las 48 h posterior a la inyección. Otros autores observaron aumento significativo de los niveles de urea y creatinina en conejos endotoxémicos posterior a la administración de una dosis IV de 100 µg/kg de LPS de *E. coli* (Elmas *et al.,* 2006). Estas dosis de LPS son 5 a 50 veces superiores a las administradas en los conejos del presente estudio, lo que da cuenta de diferencias en la intensidad de la respuesta frente a la endotoxina a nivel renal dependiendo de la dosis.

Finalmente, la RIA inducida por la administración de LPS en los conejos del presente estudio se caracterizó por la presencia de signos y síntomas como letargia, mucosas enrojecidas e inapetencia, los que se encuentran descritos en un cuadro infeccioso o febril (Van Miert, 1990).

Por lo tanto, considerando el incremento de la TC y cambios en los parámetros hematológicos y bioquímicos, además del aumento de niveles de marcadores inflamatorios como IL-6 y PCR que fueron observados en los conejos del presente modelo experimental, estos resultados demuestran el establecimiento de una respuesta inflamatoria aguda posterior a la administración de LPS de *E. coli*.

Efectos de la respuesta inflamatoria aguda sobre la disposición plasmática de florfenicol y florfenicol amina en conejos posterior a la administración de florfenicol vía intravenosa.

Diversas evidencias experimentales han demostrado que el estado febril o la respuesta inflamatoria inducida por agentes patógenos puede alterar la farmacocinética de distintos fármacos en comparación con la de individuos sanos (Van Miert, 1990, Morgan, 2009), afectando los procesos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación de los

fármacos (Renton, 2001). Esto puede traer consecuencias en el incremento de los niveles sanguíneos, aumento de la permanencia del fármaco en el organismo y la aparición de eventuales reacciones de toxicidad y efectos adversos (Renton, 2005; Gandhi *et al.,* 2012). Por otra parte, también pueden ocurrir alteraciones como disminución en la eficacia de un medicamento por dificultades en su llegada al sitio de acción, como consecuencia de cambios en su farmacocinética, todos los cuales pueden ser difíciles de predecir. Estos efectos revisten especial importancia en el caso de los antibióticos ya que estos fármacos son administrados a organismos que cursan estados infecciosos y febriles.

En los conejos del presente estudio, la RIA inducida por el LPS de *E. coli,* generó modificaciones significativas en la disposición plasmática de FFC y su metabolito FFC-a. Estos cambios se observaron posterior a la administración de FFC vía IV y luego de su administración vía IM.

El patrón de concentraciones plasmáticas de FFC observado en los conejos control del presente estudio, luego de la administración vía IV del antibiótico es similar al descrito en el estudio de Park *et al.* (2007), en conejos sanos tratados con igual dosis de 20 mg/kg de FFC por vía IV. Se observó en ambos estudios un descenso pronunciado de las concentraciones del antimicrobiano, siendo detectadas por un período de 8 horas. En los conejos tratados con LPS del presente estudio, las concentraciones de FFC tuvieron mayor persistencia en el tiempo siendo detectadas hasta las 12 h y presentaron valores significativamente mayores a las del grupo control a las 2 y 8 h posterior a la administración de FFC ($p < 0,05$).

Los valores de AUC_{0-t} y $AUC_{0-\infty}$ de FFC en los conejos control del presente estudio fueron de 16,8 y 17,2 µg* h/mL, respectivamente. Estos valores de AUC son inferiores a los reportados en el estudio de Park *et al.* (2007), quienes describen valores de AUC de 31,9 µg* h/mL. Estas diferencias en el AUC de FFC pueden atribuirse a diferencias en el *clearance* de los conejos utilizados en ambos estudios ya que el *clearance* reportado en el estudio de Park y colaboradores es menor (0,63 L/kg/h) al *clearance* determinado en el presente estudio de 1,2 L/kg/h, lo que explica el menor nivel de concentraciones plasmáticas y del promedio de AUC. Asimismo, los valores de AUC observados en el presente estudio son inferiores a los reportados por Koc *et al.* (2009) en conejos, donde los valores de AUC de FFC posterior a su administración IV fueron de 44,6 µg* h/mL. Estos valores más elevados de AUC se pueden atribuir a la dosis de FFC administrada en aquel estudio, la cual fue de 25 mg/kg. Los menores promedios de AUC observados en los conejos del presente estudio en comparación con los valores descritos por Park *et al.* (2007) y Koc *et al.* (2009), también pueden explicarse debido a los mayores promedios de Vd_{ss} respecto a los valores observados en los estudios de Park *et al.* (2007) y Koc *et al.* (2009).

La RIA inducida por LPS en los conejos del presente estudio determinó un incremento significativo en los valores de $AUC_{0-\infty}$ de FFC, desde 17,2 µg* h/mL en conejos control hasta 26,3 µg* h/mL en los conejos tratados con LPS. Estos cambios en el AUC de FFC concuerdan con las mayores concentraciones plasmáticas de FFC observadas en este grupo de conejos. Estos resultados son coincidentes con lo descrito por Elmas *et al.* (2006) en conejos, quienes observaron un incremento significativo de los valores de $AUC_{0-\infty}$ de enrofloxacino en conejos cursando una RIA inducida por LPS de *E. coli*, con

un incremento desde 2,2 hasta 3,5 µg* h/mL. Post *et al.* (2003) describen también incremento significativo de los valores de AUC de enrofloxacino en cerdos cursando una RIA, en comparación con los valores de los animales control. Los resultados de AUC del presente estudio en los conejos tratados con LPS también fueron inferiores a los valores de AUC de FFC descritos por Koc *et al.* (2015) quienes estudiaron la influencia de flunixin y tenoxicam sobre la farmacocinética de FFC en conejos cursando una endotoxemia inducida por LPS. Dichos autores reportaron promedios de AUC_{0-t} de FFC de 34,4 µg* h/mL, luego de la administración de una dosis de 20 mg/kg de FFC en conejos endotoxémicos. Estos mayores valores de AUC pueden relacionarse con menores valores de *clearance* de FFC de 0,5 L/kg/h, descritos en el estudio de Koc *et al.* (2015), los que son menores a los promedios de *clearance* determinados en el presente estudio.

En los conejos del grupo control, FFC se distribuyó ampliamente hacia los tejidos corporales alcanzando valores de volumen de distribución en estado estacionario (Vd_{ss}) de 1,4 L, lo que se explica por la alta lipofilicidad de este antibiótico, y también por el bajo porcentaje de unión a proteínas plasmáticas que presenta FFC, que se ha descrito de 11,65 % en conejos (El-Aty *et al.,* 2004) y de 18,3 % en terneros (Lobell *et al.,*1994).

Los promedios de Vd_{ss} observados en los conejos del presente estudio son similares a los promedios de Vd_{ss} de 1,45 L/kg, determinados por Park *et al*. (2008) en perros tratados con 20 mg/kg de FFC vía IV. En cambio, los promedios de Vd_{ss} de FFC son superiores a los reportados por Park *et al.* (2007) y Koc *et al.* (2009) en conejos, quienes describen valores de Vd_{ss} de 0,94 L/kg y 0,98 L/kg, respectivamente.

En los conejos tratados con LPS se observó incremento del promedio de Vd_{ss} de FFC respecto del promedio de los conejos control, sin embargo, este aumento no fue estadísticamente significativo. Esta ausencia de diferencias significativas entre ambos grupos puede explicarse por la alta variabilidad de los datos individuales.

El *clearance* representa la capacidad de un órgano o del organismo de eliminar un fármaco (Toutain y Oukessou, 1990; Toutain y Bousquet-Mélou, 2004). Este parámetro considera la suma de los *clearance* de los órganos que contribuyen a la eliminación del fármaco; principalmente, hígado y riñón (Baggot, 2001; Toutain y Bousquet-Mélou, 2004). En los conejos del grupo control se observó un *clearance* promedio de FFC de 1,2 L x h/kg, que es similar a los valores descritos por Park *et al.* (2008), en perros tratados con 20 mg/kg de FFC vía IV, quienes reportan promedios de *clearance* de 1,03 L*h/kg. En cambio, el *clearance* del presente estudio es mayor a los reportados por Park *et al.* (2007), de 0,63 L*h/kg, y también por Koc *et al.* (2009), de 0,56 L*h/kg, para el mismo antibiótico. Estas diferencias en los valores de *clearance* pueden atribuirse a diferencias entre los animales utilizados en cada estudio, como características de peso, tamaño, funcionalidad renal o funcionalidad hepática.

En los conejos tratados con LPS, la RIA causó una disminución significativa del *clearance* de FFC, obteniéndose valores de 0,8 L*h/kg, en comparación a los 1,2 L*h/kg del grupo control. Resultados similares fueron obtenidos en el estudio de Elmas *et al.* (2006) en conejos endotoxémicos en el cual se obtuvieron valores de *clearance* de enrofloxacino de 1,5 L/h/kg, promedios que son menores a los obtenidos en conejos control de 2,1 L/h/kg. Asimismo, Hu *et al.* (2013), evidenciaron una disminución

significativa del *clearance* de cefadroxilo en ratones tratados con LPS, respecto a los valores del grupo control.

El TMR indica la duración de la persistencia de un fármaco en el organismo (Riviere, 1999). El promedio de TMR de FFC de 1,1 h observado en los conejos del grupo control es concordante con el valor de 1,5 h descrito por Park *et al.* (2007). En los conejos tratados con LPS el TMR de FFC presentó incremento significativo respecto de los conejos control, lo que coincide con lo descrito por Rao *et al.* (2000) quienes observaron un aumento significativo del TMR de enrofloxacino, de 1,5 h a 2,1 h, en cabras cursando un proceso febril inducido por LPS. El incremento en el TMR de FFC observado en los conejos del presente estudio también es coincidente con los resultados determinados por Hu *et al.* (2013), quienes observaron un aumento significativo del TMR de cefadroxilo en ratones endotoxémicos, luego de su administración IV, desde 26 hasta 85,7 minutos.

Los promedios de vida media de eliminación de FFC ($t_{1/2el}$) observados en los animales control de 3,4 h son superiores a los observados en otros estudios como el de Park *et al.* (2007) y Koc *et al.* (2009) donde se reportaron promedios de $t_{1/2el}$ de FFC de 0,90 h, y 1,2 h, respectivamente. Estas diferencias pueden atribuirse al mayor Vd_{ss} observado en el presente estudio respecto de los promedios de Vd_{ss} descritos por estos autores. Los promedios de $t_{1/2el}$ presentaron incrementos significativos en los conejos tratados con LPS, en comparación con los conejos control. Lo cual es coincidente con los resultados obtenidos por Rao *et al.* (2000) quienes observaron incremento significativo de la vida media de eliminación de enrofloxacino en cabras tratadas con LPS (1,8 h), en comparación con el grupo control (1,1 h). También son concordantes con los resultados obtenidos por Post *et al.* (2003) en cerdos, donde los promedios de $t_{1/2el}$ de enrofloxacino

presentaron incrementos significativos en los animales tratados con LPS, respecto del grupo control.

En la Tabla 28 se describen los principales efectos de la RIA inducida por LPS de *E. coli* sobre la farmacocinética de diferentes antibióticos posterior a su administración IV en especies monogástricas. Los efectos de la RIA inducida por la administración de LPS sobre la farmacocinética de FFC en los conejos del presente estudio son similares a los observados para enrofloxacino en cerdos inoculados con *E. coli* (Zeng y Fung,1997) o en cerdos tratados con LPS (Post *et al.,* 2003). Los valores de volumen de distribución de estos estudios no presentaron cambios significativos entre los animales control y animales tratados con LPS. La ausencia de diferencias en los volúmenes de distribución puede atribuirse a que ambos fármacos son altamente liposolubles por lo que tienen amplio Vd, y en consecuencia es menos probable que se produzcan variaciones significativas de este parámetro en animales cursando una RIA de corta duración (Kume y Garg 1986; Rao *et al.,* 2000). Además, la ausencia de diferencias en los promedios de volumen de distribución entre animales control y tratados con LPS del presente estudio puede deberse a la variabilidad de los datos individuales, ya que 4 de los 6 animales del grupo LPS presentaron incremento de los valores de Vd_{ss} en comparación con el grupo control. En cambio, otro estudio realizado por Pijpers *et al.* (1990) en cerdos cursando neumonía aguda inducida por la inoculación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* determinaron disminución del volumen de distribución de oxitetraciclina. Diferencias en las características fisicoquímicas de oxitetraciclina y el modelo experimental utilizado podrían explicar las diferencias con los resultados del presente estudio.

En la Tabla 28 también se muestra que similar a lo observado en los animales del presente estudio se determinó que en los cerdos sometidos a respuesta inflamatoria sistémica los promedios de *clearance* para los antibióticos oxitetraciclina y enrofloxacino disminuyeron significativamente. Cambio que se puede atribuir a los efectos de los mediadores inflamatorios liberados sobre la funcionalidad renal y hepática y en consecuencia sobre la capacidad de eliminación de los fármacos (Post *et al.*, 2003; Gandhi *et al.,* 2012).

Tabla 28. Efectos de la respuesta inflamatoria aguda sobre parámetros farmacocinéticos de diferentes antibióticos administrados vía IV en monogástricos.

Especie	**Fármaco**	**Cambios en parámetros farmacocinéticos observados en animales cursando respuesta inflamatoria aguda**	**Referencia**
Conejos	Florfenicol	Disminución *clearance,* aumento $t_{1/2el}$, AUC, TMR. Vd_{ss} sin cambios significativos.	Resultados del presente estudio.
Cerdos[a]	Oxitetraciclina	Disminución *clearance,* disminución $t_{1/2el}$ y Vdβ. Incremento AUC.	Pijpers et al. (1990)
Cerdos[b]	Enrofloxacino	Disminución *clearance,* incremento $t_{1/2el}$, AUC. $Vd_{(área)}$ sin cambios significativos.	Zeng y Fung (1997)
Cerdos	Enrofloxacino	Disminución c*learance,* aumento $t_{1/2el}$ y AUC. Vdβ sin cambios significativos.	Post *et al.* (2003)

$t_{1/2el}$: vida media de eliminación; AUC: área bajo la curva; TMR: Tiempo medio de residencia, $Vd_{ss:}$ Volumen de distribución en estado de equilibrio; Vdβ: Volumen de distribución en la fase terminal. [a] cerdos fueron inoculados con *Actinobacillus pleuropneumoniae*, replicando infección respiratoria aguda. [b] Cerdos fueron inoculados con *Escherichia coli*. Fuente: Elaboración propia.

En resumen, se observó que la RIA producida por la administración de LPS en los conejos tratados con FFC vía IV disminuyó significativamente el *clearance* de FFC, cambio que se asoció a incrementos en los parámetros de $t_{1/2el,}$ TMR y AUC del antibiotico. La RIA inducida por la administración de LPS puede causar diversas alteraciones fisiopatológicas a nivel de los órganos encargados de la eliminación de fármacos: como son riñón e hígado, pudiendo producirse diferentes alteraciones como cambios hemodinámicos con disminución de flujo sanguíneo hacia estos órganos, cambios en el metabolismo mediado por enzimas metabolizadoras de fármacos como CYP450, y diversas alteraciones renales que determinan la disminución del *clearance* de los fármacos (Dutta *et al.,* 2001; Gupta *et al.,* 2007; Morgan, 2009). Considerando que FFC es eliminado por metabolismo hepático y excreción renal (Adams *et al.,* 1987), alteraciones que afecten los procesos de metabolismo y excreción pueden estar involucradas en la disminución de*l clearance* de este antimicrobiano en los conejos endotoxémicos.

La RIA inducida por la administración de LPS puede causar alteraciones de diferentes factores hemodinámicos, produciendo variaciones en el gasto cardíaco, presión sanguínea y frecuencia cardíaca (Codina y Zeitlinger, 2022). En particular, puede ocurrir disminución del gasto cardíaco por disminución del tono venomotor y retorno venoso (Dutta *et al.,* 2001), modificándose el flujo sanguíneo hacia los órganos. Estos cambios fisiopatológicos pueden causar alteraciones en las concentraciones de fármacos en el sitio de acción y en la difusión del antibiótico hacia los tejidos llevando a modificaciones en el volumen de distribución (Codina y Zeitlinger, 2022).

El metabolismo de los fármacos puede verse alterado mediante la acción de mediadores inflamatorios como citoquinas y óxido nítrico que tienen la capacidad de regular a la baja la expresión de mRNA y la actividad de distintas enzimas metabolizadoras del CYP450, y de diversos transportadores de fármacos como P-gp (Morgan, 2009; Gandhi *et al*., 2012). Estudios *in vitro* han demostrado que citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-1β y TNF-α, inducidas por la vía de transducción de señales de LPS sobre los receptores tipo-Toll 4 en la superficie de hepatocitos y células de Kupffer, regulan la expresión de genes de enzimas CYP450. (Aitken y Morgan, 2007; Gandhi *et al.,* 2012).

Entre las alteraciones renales presentes en la RIA se ha descrito que luego de la administración sistémica de LPS se produce vasoconstricción intrarenal, reducción de la tasa de filtración glomerular, reclutamiento de leucocitos y activación de la cascada de la coagulación y fibrinolisis (Singbartl y Ley, 2004; Gupta *et al.,* 2007). También se ha descrito apoptosis de células glomerulares endoteliales e infiltración de neutrófilos, los que se atribuyen a la acción de citoquinas como TNF sobre el riñón (Cunningham *et al.* 2002), además de daño en microcirculación peritubular y en células tubulares (Chvojka *et al.,* 2010).

Hu *et al.* (2013) determinaron una disminución de la tasa de filtración glomerular de cefadroxilo en ratones cursando una RIA inducida por LPS de *E. coli*, donde se observó que la tasa de filtración glomerular disminuyó aproximadamente 3 veces en comparación con los animales control, desde 0,254 mL/min a 0,079 mL/min. Estas alteraciones pueden llevar a la disminución en la excreción renal de fármacos y en consecuencia disminución del *clearance.*

Los cambios sobre el *clearance* son relevantes ya que modifican la disposión de los fármacos en el organismo, lo que puede tener importantes consecuencias sobre la farmacoterapia, produciendo variaciones en la seguridad y eficacia de los medicamentos (Gandhi *et al.,* 2012).

La forma en la cual la RIA inducida por LPS afecta la farmacocinética depende de las características de los procesos que participan normalmente en la disposición del fármaco. Factores como especies y diferencias en dosis y sensibilidad a LPS también pueden influir en el efecto de la RIA inducida por LPS sobre la farmacocinética (Post *et al*., 2003).

Se ha reportado que FFC y sus metabolitos son excretados mayormente en la orina, lo que indica que la principal ruta de excreción de este antibiótico es a través del riñón (Varma *et al.,* 1986, EMA, 1999). En un estudio en bovinos tratados con FFC vía IV, Varma y colaboradores (1986) reportaron que, más del 50% a 60 % de FFC es excretado en la orina como droga primaria sin metabolizar. En orina de bovinos se ha determinado la presencia de los metabolitos FFC-a, FFC alcohol, FFC ácido oxámico y monocloro-FFC. En las heces se ha detectado monocloroflorfenicol, florfenicol y ácido oxámico de FFC (Sams, 1994).

De acuerdo con lo reportado por Adams *et al.* (1987) en terneros de engorda tratados con 7 dosis de 11 mg/kg de FFC vía oral cada 12 h se determinaron altas concentraciones de FFC en orina, riñón y bilis. En dicho estudio las concentraciones de FFC en bilis fueron de 14 µg/mL, a las 4 h posterior a la administración de FFC, las que fueron superiores a las concentraciones plasmáticas. Según estos autores, debido a las

altas concentraciones de FFC en bilis sumado a su elevada biodisponibilidad posterior a la administración oral (88,8%), hacen suponer que FFC experimenta recirculación enterohepática (Adams *et al.,* 1987).

Respecto al metabolismo de FFC este se realiza a nivel hepático, donde es biotransformado a los diferentes metabolitos señalados anteriormente. Existe evidencia de la participación de enzimas del sistema CYP450 en su biotransformación, principalmente la subfamilia CYP3A (Liu *et al.* 2011; Wang *et al.,* 2021). La proporción de los metabolitos puede variar entre las diferentes especies animales pero el principal de ellos es FFC-a, y se le considera como parte del residuo marcador para establecer los límites máximos de residuos de FFC en tejidos animales comestibles (EMA, 1999; EMA, 2002).

En el presente estudio, una importante proporción de FFC fue metabolizada a FFC-a, representada por la relación de metabolito ó *Metabolite ratio* (MR%). En los conejos del grupo control, el MR% fue de 57,6% valor que es similar al MR% determinado por Park *et al.* (2007) de 63,03% en conejos tratados con 20 mg/kg de FFC vía IV.

Las concentraciones plasmáticas máximas del metabolito FFC-a determinadas en los conejos del grupo control, alcanzaron promedios de 2,85 µg/mL posterior a la administración IV de FFC. Estos valores son inferiores a los promedios de $C_{máx}$ de FFC-a de 5,06 µg/mL determinados en conejos luego de la administración IV de FFC en dosis de 20 mg/kg descritos por Park *et al.* (2007). Asimismo, los valores de AUC_{0-t} para FFC-a en los conejos control de 9,68 µg* h/mL, y los promedios de TMR de 2,56 h, son menores que los promedios observados por Park *et al.* (2007); de 20,6 µg* h/mL, y 3,15

h, respectivamente. En cambio, la vida media de eliminación de FFC-a de 1,61 h es concordante con el valor de $t_{1/2}$ reportado por Park *et al.* (2007) que fue de 1,84 h.

Los promedios de $C_{máx}$ de FFC-a obtenidos en los conejos del presente estudio también son inferiores a los promedios de $C_{máx}$ de FFC-a descritos por Park *et al.* (2008) de 5,67 µg/mL luego de la administración vía IV de FFC en perros. Asimismo, los promedios de AUC_{0-t} de FFC-a obtenidos en los conejos del presente estudio son menores a los promedios de AUC de 29,8 mg*h/L descritos para dicha especie. Los promedios de TMR y $t_{1/2}$ de FFC-a del presente estudio fueron también inferiores a los promedios de 3,9 h y 2,3 h, respectivamente descritos por Park *et al.* (2008).

Estas diferencias en las concentraciones máximas, AUC_{0-t} y TMR de FFC-a del presente estudio respecto a los resultados obtenidos por Park *et al.* (2007) en conejos y por Park *et al.* (2008) en perros pueden deberse a variaciones en la biotransformación de FFC entre distintos individuos y entre diferentes especies animales, a causa de diferencias en la actividad metabolizadora del sistema CYP450 (Nebbia *et al.,* 2003; Toutain *et al.,* 2010). También pueden originarse por diferencias en procesos de excreción y *clearance* del metabolito entre distintas especies (Toutain *et al.,* 2010). En los conejos tratados con LPS, las concentraciones plasmáticas máximas del metabolito FFC-a fueron significativamente menores a las concentraciones observadas en los animales del grupo control, cambios que se reflejan en una disminución de los valores de AUC_{0-t} de FFC-a en los conejos endotoxémicos. Los promedios de $t_{1/2el}$ y TMR de FFC-a fueron significativamente mayores en los conejos cursando una RIA, en comparación a los promedios del grupo control. Resultados similares han sido obtenidos por Rao *et al.* (2000) en cabras tratadas con LPS donde se evaluaron los efectos de la RIA sobre la

farmacocinética de enrofloxacino administrado vía IV, determinándose una disminución significativa de los promedios de $C_{máx}$ y $AUC_{0-\infty}$ del metabolito ciprofloxacino, cambios que estuvieron asociados a incrementos en los promedios de $t_{1/2}$ y TMR de ciprofloxacino.

En el grupo de conejos tratados con LPS, el MR% disminuyó desde un 57,6% en el grupo control a valores promedios de 22% en los conejos tratados con LPS. Estos resultados sugieren que la RIA inducida por LPS en los conejos del estudio inhibió la biotransformación de FFC. El incremento del AUC y la reducción en el *clearance* de FFC determinado en los conejos tratados con LPS es también indicativo de la disminución del metabolismo de FFC hacia su metabolito FFC-a medido a través del MR% en los conejos cursando una RIA inducida por LPS. Estos resultados son coincidentes con los encontrados por Rao *et al.* (2000), quienes reportan disminuciones significativas de los promedios de MR % de ciprofloxacino desde 28% en animales sanos hasta 8,5% en el grupo de animales tratados con LPS.

Antecedentes experimentales demuestran que el sistema CYP450, en específico la subfamilia CYP3A, cataliza la biotransformación de FFC (Liu *et al.,* 2011; Wang *et al.,* 2021). Por lo tanto, es posible atribuir la disminución de la conversión metabólica de FFC a FFC-a en los conejos tratados con LPS, a los efectos inhibitorios inducidos por la RIA sobre la expresión y función de la enzima CYP3A.

Diferentes estudios (Monshouwer *et al.,* 1996; Saitoh *et al.,* 1999 y Lee *et al.* 2008) han reportado que durante la RIA inducida por LPS se observa un decrecimiento de la actividad de las enzimas del CYP450 que están involucradas en el metabolismo de

fármacos. Monshouwer *et al.* (1996) en cerdos tratados con cinco inyecciones repetidas de LPS a intervalos de 1 h, observaron una disminución significativa en el *clearance* de antipirina, el cual se utiliza como fármaco de referencia para la evaluación de la capacidad oxidativa metabolizadora hepática. Además, se observó disminución significativa en la actividad enzimática mediada por CYP450 microsomal y en el contenido total de CYP1A y CYP3A, a las 24 h posterior a la primera administración de LPS.

Saitoh *et al.* (1999) demostraron que la RIA inducida por la administración de dosis repetidas de LPS de *E. coli* (17 µg/kg) en conejos, disminuyó significativamente el contenido total de CYP450 en microsomas hepáticos y la actividad enzimática dependiente de CYP450 desde las 24 h posterior a la primera administración de LPS hasta los tres días posteriores, en comparación con los conejos control. También se observó una tendencia a la diminución del *clearance* de antipirina y disminución en la cantidad de las enzimas CYP1A1 y CYP1A2. Adicionalmente, en otro estudio, en ratas tratadas con LPS de *E. coli* se demostró una disminución significativa del contenido de CYP3A a nivel hepático e intestinal, efecto que estuvo asociado a un aumento del $AUC_{0-\infty}$ del antibiótico telitromicina (Lee *et al.,* 2008).

Los mecanismos fisiológicos involucrados con la disminución de la expresión del CYP450 se relacionan con componentes de señalización intracelular como NF-κB, y receptores PXR y CAR, que regulan la expresión génica de CYP450 y diversos transportadores. El factor de transcripción NF-κB puede regular la expresión de genes del CYP450 mediante unión a la región promotora de los genes, o de manera indirecta a través de represión de receptores nucleares involucrados en la regulación de CYP

como PXR y CAR. También se ha descrito mecanismo post transcripcional mediante el cual NF-κB puede afectar la estabilidad de las proteínas CYP (Zordoky y El-Kadi, 2009).

Teniendo en consideración los antecedentes expuestos y los resultados obtenidos acerca de la disminución de las concentraciones plasmáticas de FFC-a y del MR%, que da cuenta de una disminución de la conversión metabólica de FFC hacia su metabolito FFC-a en los conejos tratados con LPS, es posible postular que la RIA produce disminución del metabolismo hepático de FFC mediado por CYP450 en los conejos.

Efectos de la respuesta inflamatoria aguda sobre la disposición plasmática de florfenicol en conejos posterior a la administración de florfenicol vía intramuscular.

Las concentraciones plasmáticas de FFC observadas posterior a su administración vía IM en los conejos control del presente estudio, siguieron un patrón similar al descrito por Koc *et al.* (2009), en conejos sanos tratados con 25 mg/kg de FFC vía IM, donde las concentraciones de FFC se detectaron por un período de 12 horas.

La RIA inducida por la administración de tres dosis de 2 µg/kg de LPS de *E. coli* causó cambios en la disposición plasmática de FFC y su metabolito FFC-a, tras la administración de FFC vía IM. Las curvas de concentración plasmática en el tiempo de FFC de ambos grupos experimentales siguieron un patrón de absorción similar, y se diferenciaron desde aproximadamente las 6 h en la fase donde predomina la eliminación, observándose una pendiente de la curva concentración vs tiempo menos pronunciada

en el grupo tratado con LPS. Se presentaron mayores concentraciones plasmáticas de FFC en el grupo que recibió LPS, siendo estas diferencias significativas a las 4 h (p < 0,05).

Los promedios de $C_{máx}$ de FFC obtenidos en los conejos control luego de la administración de FFC vía IM, fueron de 6,65 µg/mL, valores que son similares a los reportados por Gutiérrez *et al.* (2022) de 6,08 µg/mL en conejos tratados con 20 mg/kg de FFC administrado en alimento en forma de perlas de alginato cargadas con el antibiótico. Los promedios de $C_{máx}$ del presente estudio son levemente inferiores a promedios de $C_{máx}$ de 7,96 µg/mL, determinados por Park *et al.* (2007) en conejos tratados con 20 mg/kg de FFC vía oral. También son inferiores a los promedios de $C_{máx}$ descritos por Koc *et al.* (2009), de 8,65 µg/mL en conejos tratados con 25 mg/kg de FFC vía IM. Estas diferencias pueden atribuirse a la mayor dosis de FFC administrada en el estudio de Koc *et al.* (2009), que origina una mayor $C_{máx}$ y a diferencias en proceso de absorción debido a diferente vía de administración utilizada en el caso del estudio de Park *et al.* (2007). También pueden causar variaciones en los valores de $C_{máx}$ obtenidos, las diferencias en las formulaciones de FFC utilizadas en los distintos estudios. Al respecto, de manera similar a la formulación usada en los conejos del presente estudio, en los que se administró una solución diluida de FFC de 60 mg/mL, Park *et al.* (2007) utilizaron una solución de FFC de 40 mg/mL para facilitar la inyección IV del fármaco en conejos, y una solución al 10% para la administración oral del fármaco. Por otra parte, los valores de $C_{máx}$ determinados en el presente estudio son superiores a los valores reportados por Birdane y Birdane (2015), cuyos promedios de $C_{máx}$ fueron de 3,05 µg/mL luego de la administración de dosis de FFC de 30 mg/kg vía IM en perros. Estas

diferencias pueden atribuirse a la formulación de FFC al 30% utilizada en dicho estudio, correspondiente a la formulación original de FFC, la cual debido a su mayor concentración y a los vehículos en su composición puede originar diferencias en el proceso de absorción, y, por consiguiente, en las concentraciones plasmáticas máximas alcanzadas, causando una absorción más lenta y de menor $C_{máx}$ como fue observado en dicho estudio. En los conejos tratados con LPS, la RIA originó mayores promedios de $C_{máx}$ de FFC, los que a pesar de no presentar diferencias significativas concuerdan con los valores de AUC observados en los conejos de este grupo, que fueron significativamente mayores a los promedios de AUC del grupo control. En otros estudios se ha reportado el efecto de la RIA sobre la farmacocinética de otros antibióticos administrados vía IM; de manera similar Kume y Garg (1986) reportaron que el estado febril inducido por LPS de *E. coli* en cabras no causó cambios significativos en los promedios de $C_{máx}$ tras el tratamiento con 25 mg/kg de cloranfenicol vía IM, en el estudio de Lee *et al.* (2008), tampoco se observaron variaciones en los promedios de $C_{máx}$ de telitromicina posterior a su administración vía oral en ratas tratadas con LPS.

La vida media de absorción ($t_{1/2ab}$) de FFC en los conejos control presentó valores de 0,44 h, los que son similares a los valores reportados por Atef *et al.* (2001) de 0,63 h en cabras tratadas con 20 mg/kg de FFC vía IM. En cambio, los promedios de $t_{1/2ab}$ de FFC observados en el presente estudio son inferiores a las 2,09 h descritas por Birdane y Birdane (2015), luego de una inyección IM de 30 mg/kg de FFC al 30% en perros. Estas diferencias pueden atribuirse a la mayor concentración de la formulación de FFC utilizada en el estudio de Birdane y Birdane (2015). También son menores a los valores de $t_{1/2ab}$ reportados por Koc *et al.* (2009) en conejos tratados con 25 mg/kg vía IM de

FFC, los que fueron de 0,83 h. Estas diferencias de $t_{1/2ab}$ son indicativas de distintas velocidades de absorción del antibiótico, la cual puede depender entre otros factores de la formulación de la solución de FFC administrada o de factores propios del animal como irrigación sanguínea cercana al sitio de inyección (Lees *et al.,* 2012).

En los conejos tratados con LPS la vida media de absorción ($t_{1/2ab}$) de FFC fue significativamente mayor a la observada en los conejos control, lo que sugiere que en los animales que cursan una RIA, se retarda el proceso de absorción del antibiótico. Según Elmas *et al.* (2006), el proceso inflamatorio y febril desencadena una vasoconstricción periférica con disminución del flujo sanguíneo regional periférico para evitar la pérdida de calor. Esta vasoconstricción puede retardar la absorción intramuscular de fármacos, como se observa en los animales del presente estudio tratados con LPS.

El AUC de FFC, posterior a la administración IM del antibiótico, presentó en los conejos control promedios de 25,57 µg* h/mL para AUC_{0-12}, y de 25,94 µg* h/mL para $AUC_{0-\infty}$, valores que fueron inferiores a los promedios de AUC descritos por Koc *et al.* (2009) luego de la administración de 25 mg/kg de FFC vía IM en conejos, que se reportaron en 39,10 µg* h/mL. Los valores de AUC de FFC del presente experimento fueron similares a los observados por Park *et al.* (2007) de 23,78 µg* h/mL luego de la administración de FFC vía oral en conejos. También fueron similares a los valores de AUC de FFC determinados por Birdane y Birdane (2015), luego de la administración IM en perros (26,43 µg* h/mL), sin embargo, en aquel estudio el tiempo de muestreo se extendió por 24 h. Las diferencias en los valores de AUC de FFC entre los estudios mencionados pueden relacionarse con las diferencias en los valores de $C_{máx}$ obtenidos.

Posterior a la administración IM de FFC, en los conejos tratados con LPS se observó que los promedios de AUC_{0-t} de FFC fueron significativamente superiores a los observados en los conejos del grupo control. Estos resultados difieren de los descritos por Kume y Garg (1986), quienes reportan un incremento leve, no significativo, del AUC de cloranfenicol, posterior a su administración IM en cabras tratadas con LPS, respecto de las cabras control. En cambio, el incremento en el AUC de FFC en los conejos tratados con LPS coincide con los resultados obtenidos por Lee *et al.* (2008) en ratas tratadas con LPS donde se observó un incremento significativo del AUC de telitromicina respecto de las ratas control, posterior a la administración oral del antibiótico.

El incremento de AUC de FFC en los conejos tratados con LPS del presente estudio puede atribuirse al incremento de la vida media de eliminación del antibiótico, observado en los conejos que cursaron con una RIA, a pesar de que este aumento no fue significativo. Está descrito que, en estado de enfermedad con componente inflamatorio, la vida media de eliminación de un fármaco puede prolongarse debido a una reducción en la capacidad de metabolismo hepático o en la excreción renal del fármaco (Riviere, 1999).

Integración parámetros PK/PD de FFC en conejos, posterior a la administración intramuscular de FFC.

Con el transcurso de los años ha adquirido cada vez más relevancia la problemática de la resistencia bacteriana hacia los agentes antiinfecciosos. En consecuencia, se ha intentado optimizar el uso de los antimicrobianos, considerando que dentro de las diversas causas que contribuyen al desarrollo y propagación de este fenómeno, un factor

de riesgo importante es la exposición repetida a concentraciones subóptimas de antibióticos, debido al uso incorrecto de estos fármacos (Asín-Prieto *et al.,* 2015; Abushaheen *et al.,* 2020).

Datos farmacodinámicos los cuales describen la relación entre las concentraciones de fármaco en plasma, y los efectos farmacológicos del fármaco pueden ser útiles para diseñar regímenes de dosificación que minimicen la posibilidad de exponer a los patógenos a niveles subletales de antimicrobiano (Burgess, 1999). Por lo tanto, el uso racional de fármacos antimicrobianos debe basarse en el conocimiento de las estructuras y las vías bioquímicas dentro de la bacteria y las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los fármacos antimicrobianos. Esto incluye las consideraciones de la manera en la cual el fármaco actúa para inhibir el crecimiento o matar el microorganismo y de la extensión con la cual los fármacos son capaces de penetrar hacia el sitio de infección (AliAbadi and Lees, 2000).

El mecanismo de acción de FFC consiste en la inhibición de la síntesis de las proteínas bacterianas, y el mecanismo es el mismo para todos los antibióticos integrantes del grupo de los fenicoles: cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol. FFC actúa a nivel del centro peptidil-transferasa, donde se une de manera reversible y potente a un sitio receptor sobre la subunidad 50S del ribosoma microbiano, interfiriendo con la formación de la cadena polipeptídica (Fernández-Muñoz *et al.,* 1971; Marciniec *et al.,* 2009). FFC actúa impidiendo la unión aminoacetil del tRNA al lugar de unión de la subunidad 50S del ribosoma bacteriano (Sande y Mandell, 1980).

En la Figura 45 se presenta el sitio de acción de los fenicoles, donde se observa su unión al sitio A del centro peptidil- transferasa (Ríos, 2004).

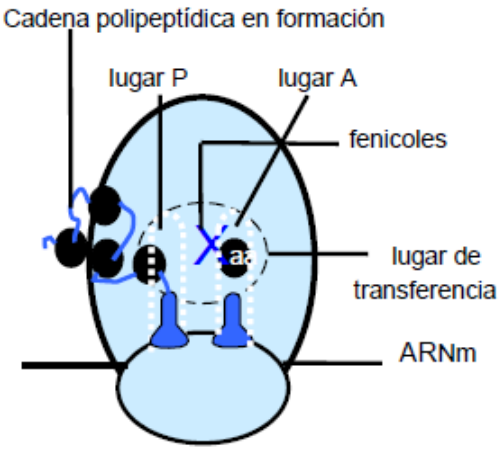

Figura 45: Sitio de acción de los fenicoles. Fuente: Extraído de Ríos, 2004.

La eficacia de la terapia antimicrobiana depende de la susceptibilidad del microorganismo patógeno frente al antibiótico administrado, de las características de exposición al antibiótico necesarias para causar la respuesta esperada, y de la habilidad para alcanzar las concentraciones activas necesarias del antibiótico en el sitio de infección (Martínez *et al.,* 2013). Por lo cual son de importancia los índices PK/PD que relacionan la farmacocinética con la farmacodinamia, esta última representada por los valores de MIC, y que permiten predecir la eficacia de los antibióticos y optimizar los regímenes de dosificación (Andes y Lepak, 2017).

Sobre la base de sus propiedades farmacodinámicas, los antibióticos pueden clasificarse como fármacos concentración-dependientes y fármacos tiempo-dependientes (Craig,

1995; Burgess, 1999; Ahmad *et al.,* 2016). Los primeros son aquellos antibióticos que ocasionan la muerte de patógenos de manera dependiente de su concentración y muestran directa relación entre las concentraciones plasmáticas altas y la rapidez de erradicación de la bacteria (Craig, 1995; Burgess, 1999). Por lo cual, para este tipo de antibióticos, los índices $C_{máx}$/MIC y AUC_{0-t}/MIC son más representativos de la eficacia del fármaco (Toutain *et al.,* 2002; Ambrose *et al.,* 2007).

Para los antibióticos tiempo-dependientes las concentraciones plasmáticas máximas no presentan gran importancia, pero la extensión de tiempo en la cual las concentraciones superan las MIC específicas del patógeno son determinantes, siendo el índice PK/PD que representa mejor la eficacia el T>MIC (Burgess, 1999; Park *et al.,* 2007).

FFC ha sido caracterizado como un antibiótico de tipo bacteriostático y tiempo dependiente (Martínez *et al*., 2013; Toutain *et al.,* 2019). Se ha reportado, sin embargo, que en dosis elevadas también puede comportarse como un antibiótico concentración dependiente. Existen estudios que han reportado la acción bactericida y concentración dependiente de FFC contra patógenos del tracto respiratorio de bovinos (Illambas *et al.,* 2013; Sidhu *et al.,* 2013). Illambas *et al.* (2013) describieron la acción concentración dependiente de FFC para *Mannheimia haemolytica* en suero de terneros. Para este patógeno, las curvas de letalidad obtenidas indicaron una respuesta bactericida rápida dentro de 4 a 8 h de incubación, con reducción mayor a 6 $\log_{10}$ en el conteo bacteriano a las 24 h. Sidhu *et al.* (2013) reportaron una acción concentración dependiente y bactericida de FFC contra los patógenos *Pasteurella multocida* y *Mannhemia haemolytica*, aislados de casos clínicos de neumonía en terneros. En dicho estudio obtuvieron curvas de inhibición de crecimiento *ex vivo* características de una acción

concentración dependiente, alcanzando un alto nivel de muerte bacteriana dentro de 4 a 8 h de exposición al antibiótico. Se reportó una acción bactericida de FFC con reducción de 3 $\log_{10}$ en el recuento bacteriano luego de la incubación en muestras de suero, exudado y trasudado de terneros.

En la Tabla 29 se resumen promedios de índices PK/PD de FFC descritos en literatura para algunos microorganismos patógenos causantes de infecciones respiratorias en diferentes especies animales. Se incluyen también los promedios PK/PD obtenidos en el presente estudio en conejos.

Tabla 29. Promedios de índices PK/PD de florfenicol para distintos microorganismos patógenos que afectan al sistema respiratorio en diferentes especies animales.

Patógeno	Valor de MIC_{90} (µg/mL)	AUC_{0-t}/MIC (h)	%T>MIC*	Especie de referencia	Autor
Pasteurella multocida/ Bordetella bronchiseptica	0,25	155,4	98	Conejos	Resultados del presente estudio.
	0,5	77,7	80,9		
	1	38,8	63,9		
	2	19,4	45,8		
Pasteurella multocida	0,48	183,4	78,4 h	Bovinos (Terneros)	Sidhu *et al.* (2013)
Mannhemia haemolytica	0,58	151,8	76,3 h		
Pasteurella multocida/ Bordetella bronchiseptica	0,25	N/A	116	Conejos	Koc *et al.* (2015)
	0,5		94		
	1		71		
	2		49		
Actinobacillus Pleuropneumoniae	0,25	58,6	41,3 h	Cerdos	Dorey *et al.* (2017)

N/A: Parámetro no especificado en el estudio correspondiente. Fuente: Elaboración propia.

En el presente estudio se consideraron valores de MIC_{90} en el rango de 0,25-2 µg/mL, que han sido descritos para FFC frente a los patógenos más comúnmente encontrados

en infecciones respiratorias de conejos: *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica* (Koc *et al.* 2015). Se calcularon los índices PK/PD: $C_{máx}$/MIC, AUC_{0-t}/MIC y %T>MIC.

De acuerdo con los resultados obtenidos para $C_{máx}$/MIC, se observó que las concentraciones plasmáticas máximas de FFC fueron más de 20 veces superiores que las MIC de 0,25 µg/mL. En el caso de las MIC de 0,5 µg/mL superaron más de 10 veces este valor, y para las MIC de 1 y 2 µg/mL, superaron más de 3 veces el valor de MIC, en los conejos control y tratados con LPS. Se observó una tendencia (p=0,09) en el grupo tratado con LPS a presentar mayores valores de $C_{máx}$/MIC de FFC para las MIC de 0,25 µg/mL y 0,5 µg/mL, en comparación con el grupo control. Según los antecedentes expuestos por Burgess (1999), resultados de relación $C_{máx}$/MIC entre 8 a 12 se asocian a 90 % de éxito de la terapia clínica, evaluada como tasa de respuesta clínica. Por lo tanto, los resultados de $C_{máx}$/MIC obtenidos para las MIC de 0,25 µg/mL y 0,5 µg/mL, de más de 25 y 10, respectivamente, demuestran una eficacia terapéutica adecuada de FFC en los conejos control y tratados con LPS del presente estudio.

Respecto a los resultados obtenidos para el índice AUC_{0-t}/MIC, es decir la relación de área bajo la curva de FFC sobre MIC, estos valores fueron mayores a 100 h para la MIC de 0,25 µg/mL, y mayor a 50 h para la MIC de 0,5 µg/mL, en los conejos control. En los conejos tratados con LPS los promedios de AUC_{0-t}/MIC fueron significativamente mayores en comparación con los promedios de los conejos control, y se obtuvieron promedios mayores a 150 h y 70 h, considerando las MIC de 0,25 y 0,5 µg/mL, respectivamente. Según lo descrito por Burgess (1999) y Toutain *et al.* (2002), valores de AUC_{0-t}/MIC de 125 h indican éxito terapéutico, con una tasa de cura microbiológica

de 80%. Por lo cual, según los resultados del presente estudio, FFC demostró una eficacia terapéutica óptima para la MIC de 0,25 µg/mL, tomando en consideración el parámetro de AUC_{0-t}/MIC. Para las demás MIC las tasas de cura microbiológica alcanzadas serían menor al 30% (Burgess, 1999).

Por último, para el parámetro %T>MIC, para un intervalo de administración de FFC de 8 h, las concentraciones plasmáticas del antibiótico superan los valores de MIC de 0,25 y 0,5 µg/mL alrededor de un 100 % del tiempo, para ambos grupos experimentales. Mientras que para las MIC de 1 y 2 µg/mL, los valores de %T>MIC, fluctuaron entre un 76 a un 95%, y entre 53 a 70 %, respectivamente, donde los porcentajes más altos corresponden a los valores observados en los conejos LPS.

Al considerar un intervalo de 12 h, el grupo tratado con LPS alcanza valores cercanos al 100% de tiempo en el cual las concentraciones de FFC superan los valores de MIC de 0,25 µg/mL. Al considerar valores de MIC de 0,5 µg/mL y 1 µg/mL los porcentajes superan al 50%, mientras que para las MIC de 2 µg/mL los valores de porcentaje de tiempo son inferiores al 50%, para ambos grupos experimentales. Se observaron diferencias significativas entre ambos grupos para el índice %T>MIC, donde los conejos tratados con LPS tuvieron mayor porcentaje de tiempo sobre los valores de MIC para ambos intervalos de administración del antibiótico y en el caso de los diferentes valores de MIC para los principales microorganismos que causan infecciones respiratorias en conejos.

De acuerdo con lo descrito por Burgess (1999), índices %T>MIC superiores a 40% se relacionan con altas tasas de cura bacteriológica, mientras que Toutain *et al.* (2002)

considera valores de 50-80% del intervalo de dosis para alcanzar un efecto bactericida óptimo. En el presente estudio se obtuvieron promedios de %T>MIC mayor al 50% para las MIC de 0,25, 0,5 y 1 µg/mL en los conejos control y tratados con LPS, lo que indica una eficacia terapéutica óptima de FFC en los conejos del presente estudio, sobre estos valores de MIC.

Los parámetros PK/PD de $C_{máx}$/MIC y AUC_{0-t}/MIC están bien establecidos para los antibióticos del grupo de las fluoroquinolonas y aminoglicósidos, y %T>MIC para los beta-lactámicos y macrólidos, sin embargo, para otros antibióticos como FFC no están aún bien definidos y el cálculo de dosificaciones de FFC dependerá de la sensibilidad del microorganismo individual, MIC en particular, sitio de infección y respuesta clínica específica (Burgess, 1999; Toutain *et al.*, 2002; El-Aty *et al.,* 2004).

En el estudio de Sidhu *et al.* (2013), se propuso al índice AUC_{0-t}/MIC como predictivo de eficacia clínica de FFC sobre *P. multocida* y *M. Haemolytica* como patógenos causantes de neumonía en terneros. Toutain *et al.* (2019), propone que los índices PK/PD que se aplican a FFC de mejor manera son AUC/MIC y T>MIC. Burgess (1999) considera a AUC/MIC como un parámetro que se ajusta adecuadamente a antibióticos concentración y tiempo-dependientes, y se considera de mayor capacidad predictiva que $C_{máx}$/MIC debido a los potenciales efectos adversos que se han descrito para algunos antibióticos concentración-dependientes como las fluoroquinolonas, considerando a este índice de referencia.

Martínez *et al.* (2013) considera a FFC como antibiótico tiempo dependiente con %T>MIC como referencia. De manera similar en el estudio de Koc *et al.* (2015) se

consideró en conejos el índice %T>MIC como referencia para la eficacia de FFC sobre los patógenos *P. multocida y B. bronchiseptica.*

Según los antecedentes expuestos anteriormente y los resultados de los parámetros PK/PD obtenidos en el presente estudio, en conejos que recibieron tratamiento con 20 mg/kg de FFC vía IM, el parámetro %T>MIC sería más representativo de la eficacia terapéutica de FFC. Los resultados de los índices PK/PD evaluados permiten respaldar la eficacia de FFC como antibiótico en conejos.

Efectos de la respuesta inflamatoria aguda sobre la disposición plasmática de florfenicol amina en conejos posterior a la administración de florfenicol vía intramuscular.

De acuerdo con los antecedentes analizados en literatura, no existen reportes previos acerca de la farmacocinética de FFC-a en animales tratados con FFC vía IM, cursando una respuesta inflamatoria aguda, por lo cual los resultados del presente estudio representan un aporte en esta área del conocimiento.

En esta investigación, en los conejos control los promedios de $C_{máx}$ de FFC-a, posterior a la administración IM de FFC, fueron de 1,90 µg/mL, valores que son inferiores a los promedios de $C_{máx}$ de FFC-a obtenidos posterior a la administración vía IV de FFC (2,85 µg/mL). Esto puede explicarse debido a la influencia del proceso de absorción sobre las concentraciones de FFC alcanzadas en plasma, luego de la administración vía IM de FFC y, por lo tanto, por esta vía de administración se encuentra disponible menor concentración de FFC para ser metabolizado a FFC-a, lo cual origina menores concentraciones del metabolito en este caso.

Los promedios de $C_{máx}$ de FFC-a, obtenidos en el presente estudio, de 1,90 µg/mL, son menores a los descritos por Park *et al.* (2007) en conejos tratados con 20 mg/kg de FFC vía oral, en los cuales se obtuvieron promedios de 3,38 µg/mL de FFC-a. También son inferiores a los promedios de $C_{máx}$ de FFC-a, de 3,64 µg/mL descritos por Park *et al.* (2008) en perros tratados con 20 mg/kg de FFC vía oral. Estas diferencias pueden explicarse por diferencias en el proceso de absorción de FFC entre los diferentes estudios, donde las distintas formulaciones utilizadas que fueron de FFC al 10% en el estudio de Park *et al.* (2007), de 200 mg/mL en el estudio de Park *et al.* (2008), y de FFC en solución de 60 mg/mL, en el presente estudio, pueden determinar diferencias en la velocidad de absorción del fármaco en cuanto a concentraciones plasmáticas alcanzadas y cantidad de antibiótico disponible para ser metabolizado a FFC-a.

Las diferencias en las $C_{máx}$ de FFC-a pueden explicarse también por diferencias en los métodos de extracción y sistemas de detección del analito mediante HPLC. Tanto en el estudio de Park *et al.* (2007) como en el estudio de Park *et al.* (2008), el sistema de detección utilizado fue a través de HPLC acoplado a espectrometría de masa (LC-MSD) el cual posee una mayor sensibilidad de detección del analito, lo cual pudiera originar la determinación de mayores concentraciones de FFC-a.

Los promedios de $AUC_{0-\infty}$ de FFC-a en los conejos control, de 12,7 µg* h/mL, obtenidos luego de la administración vía IM de FFC, son levemente inferiores a los reportados por Park *et al.* (2007) de 17,82 µg* h/mL, luego de la administración oral de FFC en conejos. Asimismo, los valores difieren de los reportados por Park *et al.* (2008), que fueron de 17,86 µg* h/mL, en perros tratados con 20 mg/kg de FFC vía oral.

La relación metabolito/FFC obtenida en los conejos del grupo control tratados con FFC vía IM, fue de 45,5%, mientras que en los conejos tratados por vía IV fue de 57,6%. Considerando que el AUC de FFC-a fue menor en los conejos tratados por vía IV, respecto de la administración vía IM, se esperaría que el MR% sea menor. Sin embargo, el menor valor de AUC de FFC observado en los conejos control tratados por vía IV determina que proporcionalmente el MR determinado para la vía IV sea mayor al estimado para la vía IM.

Los promedios de MR% de FFC-a en los conejos control tratados con FFC vía IM son menores a los reportados por Park *et al.* (2007) de 75,65 %, obtenidos luego de la administración oral de FFC en conejos. Estas diferencias pueden deberse a la mayor absorción de FFC evidenciada por el mayor promedio de $C_{máx}$ de FFC alcanzado en el estudio de Park *et al.* (2007).

La RIA inducida por la administración de LPS en los conejos del presente estudio tuvo efectos significativos sobre distintos parámetros farmacocinéticos de FFC-a, posterior a la inyección IM de FFC. Los promedios de $C_{máx}$ de FFC-a en los conejos tratados con LPS fueron levemente menores que los observados en los conejos control. Diferencias que no fueron estadísticamente significativas. En cambio, en los conejos tratados con FFC vía IV, los promedios de $C_{máx}$ de FFC-a fueron menores en los conejos tratados con LPS que en los conejos control. Esto puede atribuirse a diferencias en los efectos de la RIA sobre la biotransformación de FFC entre ambas vías de administración, o sobre los procesos de excreción renal del metabolito, los que afectan al *clearance* del metabolito.

El MR% de FFC-a disminuyó en los conejos tratados con LPS luego de la administración IM de FFC (p= 0,064), resultado que coincide con la disminución significativa de MR% en los conejos tratados con LPS en los que se administró FFC vía IV. Estos resultados concuerdan con los descritos por Rao *et al.* (2000) en cabras tratadas con enrofloxacino cursando un estado febril donde se observó una reducción significativa del MR% (ciprofloxacino/enrofloxacino) en los animales tratados con LPS. Considerando que los promedios de $AUC_{0-\infty}$ de FFC-a presentaron un aumento significativo en los conejos tratados con LPS posterior a la administración IM de FFC, esta disminución del MR% se podría atribuir al mayor AUC de FFC observado en los conejos tratados con LPS.

La constante de eliminación (Kel) del metabolito fue significativamente menor en el grupo tratado con LPS, cambio que estuvo asociado a una mayor vida media de eliminación (p < 0,06). Resultados que son similares a los observados en conejos endotoxémicos tratados con FFC vía IV.

Los cambios observados sobre los parámetros farmacocinéticos de FFC-a y FFC en los conejos tratados con LPS, posterior a la administración IM, pueden atribuirse a modificaciones hemodinámicas inducidas por la RIA que disminuyen la capacidad de excreción renal de los fármacos o metabolitos. La acción del LPS causa disminución del flujo sanguíneo renal, lo que disminuye la filtración glomerular y produce disfunción de la microcirculación peritubular, con lo cual se disminuye la excreción renal del fármaco (Chvojka *et al.,* 2010). Los mediadores inflamatorios liberados en la RIA también pueden causar inhibición del metabolismo farmacológico hepático, según lo descrito anteriormente en conejos tratados con FFC vía IV, lo que en conjunto con alteraciones de excreción renal pueden ser determinantes en la reducción del *clearance* de FFC-a.

Efectos de la respuesta inflamatoria aguda sobre la distribución tisular de florfenicol y florfenicol amina en conejos.

En los conejos del grupo control, las concentraciones tisulares de FFC presentaron valores más elevados en riñón, con promedios de 7,85 µg/g, seguidos en orden decreciente por músculo (4,59 µg/g), bazo (4,12 µg/g), pulmón (3,79 µg/g), hígado (2,66 µg/g) y cerebro (1,01 µg/g). Las concentraciones más altas de FFC en riñón se explican por ser este el principal órgano excretor del antibiótico (Varma *et al.,* 1986). Las bajas concentraciones de FFC a nivel de hígado se deben a que este es el lugar de conversión metabólica hacia su metabolito FFC-a. En los conejos control, las concentraciones de FFC-a observadas en hígado fueron superiores a las concentraciones de FFC en este órgano, lo que es indicativo de un rápido metabolismo de FFC.

Adams *et al.* (1987) determinaron concentraciones tisulares de FFC en terneros tratados con 7 dosis de FFC de 11 mg/kg cada 12 h, vía oral. A las 4 h de muestreo se observaron las mayores concentraciones de FFC, determinándose altas concentraciones de FFC en orina, donde se obtuvieron promedios de 444,5 µg/mL, también en riñón, con alrededor de 11 µg/g y en bilis se observaron concentraciones de casi 14 µg/mL. En los conejos del presente estudio, las concentraciones de FFC fueron menores a las concentraciones descritas por Adams *et al.* (1987), en riñón, pulmón, hígado y bazo. En cambio, fueron similares a las concentraciones obtenidas en músculo y cerebro. En ambos estudios las concentraciones de FFC presentaron altos promedios a nivel de riñón.

En estudio realizado por Li *et al.* (2006) en cerdos tratados con dos dosis de 20 mg/kg de FFC vía IM cada 24 h, se observó que a las 24 h posterior a la segunda dosis las

concentraciones fueron de 1,7 µg/g en riñón, 0,4 µg/g en hígado y de 0,8 µg/g en músculo. Las diferencias observadas en las concentraciones tisulares de FFC entre ambos estudios, se deben a diferencias en el tiempo de muestreo, donde la medición se realizó a las 4 h posterior al tratamiento con FFC, respecto de los residuos medidos en cerdos a las 24 h posteriores a último tratamiento con antibiótico, lo que demuestra una corta persistencia de concentraciones residuales del fármaco.

Las diferencias observadas en las concentraciones tisulares de FFC del presente estudio y el de Adams *et al.* (1987) pueden deberse a diferencias en las dosificaciones de FFC administradas, y también a diferencias de especie en cuanto a los procesos de absorción y distribución del fármaco hacia los tejidos, factores que son determinantes de las concentraciones alcanzadas en los diferentes órganos. La concentración tisular de un fármaco depende tanto de las propiedades fisicoquímicas del fármaco como de características fisiológicas del animal. Entre las características fisicoquímicas del fármaco se encuentran la liposolubilidad, la polaridad y el tamaño molecular que determinan la difusión del fármaco a través de las membranas celulares (Bergeron 1986; Lees y Toutain, 2012). También es relevante el flujo sanguíneo y el porcentaje de unión a proteínas plasmáticas, todos estos factores pueden ser determinantes en la captación de fármaco por los tejidos (Bergeron, 1986; Bellmann *et al.,* 2004; Lees y Toutain, 2012). Tal es el caso de FFC, que, al ser un fármaco altamente liposoluble, de baja afinidad por las proteínas del plasma y con amplio Vd_{ss} tiene la capacidad de difundir hacia los compartimentos intra y extracelulares de los tejidos (Park *et al.,* 2008; Lees y Toutain, 2012). Según lo descrito por Lobell *et al.* (1994) las altas concentraciones de FFC alcanzadas en tejidos y su bajo porcentaje de unión a proteínas plasmáticas se

relacionan con un incremento en el alcance de concentraciones clínicamente efectivas del antibiótico en el sitio de infección. Adams *et al.* (1987) reportaron porcentajes de unión de FFC a proteínas plasmáticas de 22% en bovinos, mientras que en conejos se han descrito porcentajes de unión más bajos, de 11,6 % (El-Aty *et al.,* 2004).

En los conejos tratados con LPS la respuesta inflamatoria modificó la distribución tisular de FFC. Esto se evidenció por el incremento en las concentraciones de FFC en los tejidos en comparación con el grupo control. Sin embargo, este incremento fue significativo para las concentraciones de FFC en músculo, alcanzando concentraciones de 9,05 ± 1,59 µg/g en los conejos tratados con LPS, mientras que en el grupo control las concentraciones fueron de 4,59 ± 0,94 µg/g. Se observó una tendencia (p= 0,093) en pulmón a presentar mayores concentraciones en el grupo tratado con LPS (7,16 ± 1,82 µg/g) respecto del grupo control (3,79 ± 0,75 µg/g).

El incremento de concentraciones tisulares en los animales tratados con LPS del presente estudio es coincidente con los resultados descritos por Hu *et al.* (2013), quienes estudiaron el efecto del estado inflamatorio inducido por LPS en ratones, sobre la disposición plasmática y concentraciones tisulares de cefadroxilo. Los resultados demostraron un marcado incremento en las concentraciones plasmáticas y tisulares del antibiótico en el grupo tratado con LPS. Se observó incremento significativo de las concentraciones de cefadroxilo en fluido cerebroespinal, corteza cerebral, corazón, pulmones, hígado y bazo.

Asimismo, los resultados del presente estudio son coincidentes con los descritos por Jorda *et al.* (2022), quienes evaluaron el efecto de la administración vía IV de LPS de *E.*

coli en dosis de 2 ng/kg, en voluntarios humanos sanos, sobre la difusión de tedizolid a tejido muscular. Se determinó que la administración de la endotoxina estuvo asociada a un incremento de concentraciones de tedizolid en líquido intersticial muscular, sin afectar sus concentraciones plasmáticas.

En el presente estudio se observó una distribución diferencial de FFC hacia los tejidos excretores, reportándose las mayores concentraciones a nivel renal. Esto coincide con lo observado en el estudio de Varma *et al.* (1986) en terneros de engorda, donde FFC mantuvo altas concentraciones en la orina por más de 30 horas. Las mayores concentraciones de FFC observadas en riñón en el presente estudio indican que este podría ser una buena alternativa de antibiótico para tratar infecciones en el tracto urinario (Adams *et al.,* 1987). Asimismo, las concentraciones observadas en pulmón que fueron de 3,79 ± 0,75 µg/g en el grupo control, y de 7,16 ± 1,82 µg/g en el grupo LPS, son superiores a los valores de MIC_{90} descritos para *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica* que se encuentran en el rango de 0,25 a 2 µg/mL, y representan los principales patógenos respiratorios de conejos (Koc *et al.* 2015). Por consiguiente, al administrar una dosis de FFC de 20 mg/kg vía IM en conejos que cursen con infecciones respiratorias producidas por estos patógenos, es posible alcanzar concentraciones terapéuticas a nivel de pulmón, que son eficaces frente a los principales microorganismos encontrados en infecciones respiratorias.

El cálculo respecto a la relación tejido/plasma (T/P), permite estimar la proporción de FFC que se distribuye a los tejidos. Este cuociente fue mayor en los animales tratados con LPS, sin embargo, debido a la alta variabilidad de los datos no se presentaron diferencias significativas respecto a los conejos control. El incremento de la relación T/P

demuestra una mayor difusión del fármaco hacia los tejidos, en congruencia con la elevada liposolubilidad de FFC, el cual tiene la capacidad de penetrar en los compartimentos intra y extracelulares de los tejidos (Lees y Toutain, 2012). En el estudio de Hu *et al.* (2013), se estudió la relación tejido/sangre de cefadroxilo. A diferencia del presente estudio, dichos autores reportaron una disminución significativa de este parámetro en riñón, en los ratones tratados con LPS, respecto de los ratones control.

En los conejos control las mayores concentraciones tisulares del metabolito FFC-a se observaron en riñón (9,69 µg/g), seguido por hígado (5,92 µg/g), bazo (4,77 ± 1,44 µg/g), pulmón (2,21 ± 0,58 µg/g), músculo (1,42 ± 0,27 µg/g), y cerebro (0,70 ± 0,14 µg/g), estos resultados demuestran que el metabolito se concentra en los tejidos encargados de la excreción y eliminación de fármacos.

Un estudio realizado por Lane *et al.* (2007) en ovinos tratados con 40 mg/kg de FFC cada 24 h por 3 días, determinaron residuos de FFC en tejidos, midiendo las concentraciones de FFC-a como residuo marcador de FFC. A los 5 días posteriores a la tercera dosis de antibiótico se detectaron concentraciones de 18,27 µg/g en hígado, 0,59 µg/g en músculo y 4,1 µg/g en riñón. Las concentraciones de FFC-a del presente estudio en hígado son menores a las concentraciones determinadas por Lane *et al.* (2007), esto se explica debido a las diferencias en la dosis y frecuencia de administración de FFC entre ambos estudios. En los conejos tratado con LPS la RIA modificó la distribución tisular de FFC-a, observándose incrementos significativos de las concentraciones del metabolito en hígado, músculo y bazo. También se observó una tendencia hacia valores significativamente mayores en pulmón ($p= 0,0886$).

El aumento de concentraciones de FFC y FFC-a en tejidos de los conejos tratados con LPS, junto con las altas concentraciones de FFC-a observadas en riñón se explican por disminución del *clearance* observado en conejos endotoxémicos tratados con FFC vía IV, asociado a alteraciones de la funcionalidad renal. Se ha descrito que, en presencia de infección o inflamación, los cambios fisiopatológicos pueden causar alteraciones en las concentraciones de fármacos en el sitio de acción y en la difusión de antibióticos hacia los tejidos (Codina y Zeitlinger, 2022), modificándose los factores de unión a proteínas plasmáticas del fármaco, flujo sanguíneo y permeabilidad capilar (Codina y Zeitlinger, 2022).

También se han descrito incrementos de la permeabilidad vascular con salida de fluido hacia el intersticio de tejidos, además de hipotensión y acúmulo de sangre en el circuito venoso (Riviere, 1999; Chvojka *et al.,* 2010). Se describe que en presencia de RIA inducida por LPS el flujo sanguíneo se redistribuye desde la piel hacia los tejidos productores de calor como el músculo, favoreciendo la distribución y llegada de fármacos hacia los tejidos y órganos fuertemente irrigados (Van Miert 1990).

Al relacionar las concentraciones tisulares de FFC-a del presente estudio con la disminución del MR% obtenido en los conejos tratados con LPS, se observó que las concentraciones tisulares de FFC-a en hígado aumentaron respecto de las concentraciones de los conejos control, lo que se contrapone con la disminución del porcentaje de la relación AUC FFC-a/AUC FFC a nivel plasmático. Resultados que demuestran que la disminución del *clearance* observada en los conejos tratados con LPS sería originada principalmente por alteraciones en la excreción renal de FFC y su

metabolito, asociado a modificaciones en el flujo sanguíneo hepático y acúmulo del metabolito en hígado.

DISCUSIÓN

ESTUDIOS OVINOS

2. Discusión resultados obtenidos en ovinos.

Efectos de la RIA inducida por el lipopolisacárido de *E. coli* como inductor de respuesta inflamatoria aguda en ovinos.

En el modelo animal ovino del presente estudio se confirmó el establecimiento de una respuesta inflamatoria aguda en los animales, posterior a la inyección de tres dosis de 1 µg/kg de LPS de *E. coli* vía IV. La RIA se determinó mediante el incremento de la TC, además de la observación de cambios en los parámetros hematológicos y bioquímicos, y de variaciones en los marcadores inflamatorios IL-6 y PCR.

La administración de LPS indujo una respuesta febril caracterizada por dos alzas significativas de la TC posterior a la primera administración de LPS, coincidentes con un patrón febril bifásico. El primero de estos *peak* se produjo 1 h tras la administración de LPS y el segundo *peak* a las 3,5 h. Luego de la segunda y tercera administración de LPS el incremento de temperatura fue de tipo monofásico. El incremento máximo de TC se produjo a las 8 h posteriores a la segunda inyección de LPS, alcanzando promedio máximo de 40,6°C con un alza de 1,1 °C en comparación con 39,5°C de los ovinos control.

Como se ha descrito anteriormente el proceso febril es indicativo del establecimiento de una respuesta inflamatoria sistémica inducida por LPS y en su desarrollo es fundamental el rol de las prostaglandinas (PGE_2) junto con citoquinas pirógenas como IL-6, IL-1β y TNF-α (Romanovsky *et al.,* 2005; Steiner *et al.,* 2006; Mota y Madden, 2022). Los resultados observados en los ovinos del presente estudio son similares a los descritos por otros autores en rumiantes tratados con LPS para inducir una respuesta inflamatoria.

Kumar y Malik (2003) estudiaron el efecto de la endotoxemia en terneros tratados con cinco dosis de 1 µg/kg de LPS de *E. coli* similar a la utilizada en el presente estudio, observándose incrementos significativos de la TC, con un alza de 1 °C por sobre el nivel basal de temperatura. Asimismo, en el estudio realizado por Jones *et al.* (2000) se indujo inflamación sistémica en ovejas mediante infusión de 50 µg LPS de *E. coli*/oveja, a velocidad de 0,35 mL/min por 30 minutos. Se observó un alza significativa de temperatura cercana a 2 °C, que ocurrió 1 h posterior a la inyección de LPS y se mantuvo aumentada por un período de 7 h.

En diferentes modelos animales se ha demostrado que la RIA inducida por LPS incrementa las concentraciones sanguíneas de IL-6. Jones *et al.* (2000) observaron incremento significativo de las concentraciones de IL-6 en plasma de ovejas tratadas con LPS, efecto que se observó a las 2 h posteriores a la administración de LPS y se mantuvo por 12 h. Asimismo, Naylor *et al.* (2020) determinaron en ovinos diferentes marcadores de endotoxemia inducida por LPS, entre ellos IL-6, luego de la administración IV de 0,4 µg/kg de LPS. Se observó un incremento significativo de las concentraciones de IL-6 desde las 2 h hasta las 6 h posteriores a la administración de LPS (Figura 46).

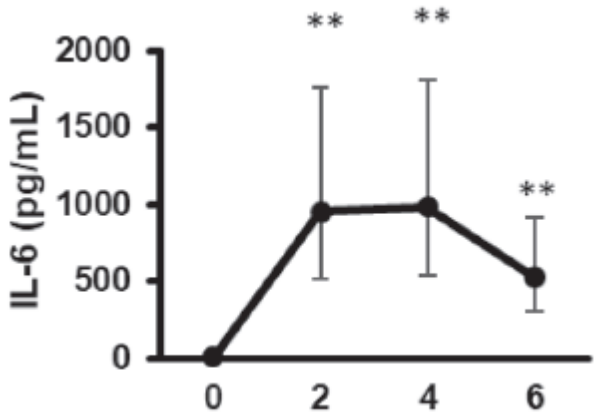

Figura 46. Concentraciones plasmáticas de IL-6 en ovejas adultas. Fuente: Extraído de Naylor *et al.* 2020.

Carroll *et al.* (2009) caracterizaron la RIA inducida por la administración de 2,5 µg/kg de LPS de *E. coli* O111:B4 vía IV en bovinos y midieron los niveles de diferentes marcadores inflamatorios entre ellos IL-6, TNF-α e IL-1β. Se observó un pronunciado incremento en las concentraciones de IL-6 en los animales que recibieron LPS, a las 2 h posterior a la inyección. Respecto a los niveles de IL-6 en los ovinos del presente estudio, las concentraciones observadas fueron bajas, y menores a las reportadas en otros estudios como el de Carroll *et al.* (2009) y Naylor *et al.* (2020). No obstante, se observó tendencia a presentarse incrementos significativos en las concentraciones de IL-6 en los ovinos tratados con LPS, respecto al grupo control.

Por lo cual, considerando los resultados obtenidos y los antecedentes descritos en literatura donde una dosis similar o inferior a la utilizada en el presente estudio induce en ovinos un incremento significativo de IL-6, es posible confirmar el establecimiento de una RIA en los ovinos del presente estudio.

Referente a las variaciones en las concentraciones de proteína C reactiva realizada en este estudio, se observó un incremento leve de las concentraciones de PCR en los ovinos tratados con LPS de *E. coli,* respecto a los valores del grupo control, alcanzando concentraciones promedio de 21,4 µg/mL en los ovinos tratados con LPS de *E. coli*. Este aumento se inició a las 4 h y se mantuvo hasta las 24 h de medición. Si bien este incremento no fue significativo respecto al factor tiempo presentó una tendencia a ser estadísticamente significativo para el factor tratamiento en los ovinos. La PCR está considerada una proteína de fase aguda (*Acute phase protein:* APP), la cual puede presentar incrementos de sus concentraciones en presencia de infecciones, inflamación o trauma (Cerón *et al.,* 2005; Cray *et al.,* 2009) y se clasifica como APP media o de incremento moderado en ovinos (Cray *et al.*, 2009).

Ulutas y Ozpinar (2006) determinaron incrementos significativos de concentraciones de PCR en ovinos luego de inoculación bacteriana con *Mannheimia haemolytica,* alcanzando valores de 9 µg/mL. Estos valores son levemente inferiores a las concentraciones de PCR determinadas en el presente estudio. También se han detectado en bovinos incrementos de concentraciones de PCR en vacas cursando con mastitis (Schroedl *et al.,* 2003). En un estudio en terneros de lechería se determinaron concentraciones de PCR de 4,47 µg/mL en plasma de terneros antes de la toma de calostro y valores de alrededor de 10 µg/mL 1 día después de la ingesta de calostro (Schroedl *et al.,* 2003). Estos valores observados en animales sanos son similares a los valores determinados en los ovinos control del presente estudio, que fueron de 13,0 µg/mL en su nivel basal y de 15,3 µg/mL a las 24 h de muestreo.

Respecto a los efectos de la RIA sobre los parámetros hematológicos y bioquímicos en ovinos, se observó una marcada leucopenia en los animales tratados con LPS. Esta leucopenia estuvo asociada a linfopenia, monocitopenia y neutropenia. Posteriormente, a las 24 h se observó una neutrofilia respecto a los valores basales en los ovinos tratados con LPS. Esto coincide con lo esperado en una RIA donde se describe que puede ocurrir un descenso de los niveles de leucocitos circulantes y una posterior leucocitosis en respuesta a la administración de LPS bacteriano (Gridley *et al.,* 2007). En un estudio donde se administró LPS de *E. coli* en ovejas (Hadfield *et al.,* 2018) en dosis de 2,5 µg/kg, se observó un descenso en los recuentos de leucocitos en los animales tratados con endotoxina, 1 h posterior a la administración de LPS, mientras que en el presente estudio este descenso ocurre entre las 4 y 8 h, por lo cual es posible relacionar directamente la dosis de LPS con la magnitud de la leucopenia generada. En otro estudio realizado en bovinos de lechería donde se administraron 3 dosis consecutivas de LPS de 10, 100 y 1000 ng/kg vía endovenosa, se obtuvo una respuesta de leucopenia seguida de leucocitosis con las dosis más altas de 100 y 1000 ng/kg, mientras que con la administración de la dosis más baja de 10 ng/kg no se observó la leucocitosis posterior a la leucopenia (Jacobsen *et al*., 2005).

En cuanto a los niveles de proteínas totales (PT), se observó un descenso significativo a las 24 h en los ovinos tratados con LPS. Las proteínas totales están constituidas por la albúmina y globulinas. Un aumento en las proteínas totales pudiera esperarse en presencia de infección debido al aumento de las gamma globulinas. Por otra parte, un descenso de las PT como el observado en los ovinos del presente estudio se puede atribuir a un probable descenso en la albúmina; proteína conocida por disminuir sus

niveles en presencia de inflamación o infecciones (Murata *et al.*, 2004; Ceciliani *et al.,* 2012). Esta proteína actúa como reserva de aminoácidos y en presencia de una RIA, al disminuir la síntesis de albúmina a nivel hepático, aumenta el pool de aminoácidos libres y pudiera ocurrir que estos aminoácidos se destinen a la síntesis de otras proteínas que sean necesarias para las defensas del organismo (Cerón *et al.,* 2005), como por ejemplo la síntesis de anticuerpos y citoquinas (Ceciliani *et al*., 2012).

Las concentraciones de creatinina y urea aumentaron significativamente en los ovinos tratados con LPS del presente estudio. Para creatinina el incremento se observó entre las 8 y 24 h posteriores a la administración de LPS, mientras que el incremento en las concentraciones de urea se observó a las 24 h post LPS. Estos resultados indican alteración de la funcionalidad renal. Se describe que la RIA inducida por LPS bacteriano puede generar alteración de la función de los órganos excretores provocando disfunción renal (De Vriese *et al.,* 2003; Singbartl y Ley, 2004). Resultados similares han sido descritos por Van Miert & Van Duin (1982), en cabras enanas tratadas con 0,1 µg/kg de LPS en las que se observó un incremento de las concentraciones de urea que alcanzó un aumento significativo a las 24 h.

Con relación a las enzimas hepáticas aspartato aminotransferasa (AST) y gamma glutamil transferasa (GGT) no se encontraron diferencias significativas entre ovinos control y tratados con LPS. Estos resultados difieren de otros estudios en los cuales se ha inducido una RIA mediante la inyección de LPS y se han observado aumento de las enzimas hepáticas, tal como el estudio de Elmas *et al.* (2006), en el cual se administró una dosis alta de LPS en conejos (100 µg/kg) y se observó un incremento significativo de las enzimas hepáticas AST y ALT en los conejos endotoxémicos. Esto puede

atribuirse a que la respuesta inducida por la dosis de LPS de 1 µg/kg en el presente estudio fue leve y no alcanzó a generar un daño hepático de magnitud tan severa como para verse reflejado en un incremento de las enzimas hepáticas a nivel sanguíneo. Por lo tanto, la RIA inducida por LPS en los ovinos fue moderada y bien tolerada por el organismo, sin indicios de daño hepático. Estos resultados concuerdan con lo obtenido por otro estudio del presente grupo de investigación, donde Riquelme *et al.* (2018) reportaron que en ovinos la RIA inducida por 1 µg/kg de LPS no indujo un incremento significativo de las enzimas hepáticas AST y GGT.

En los ovinos del presente estudio la RIA se caracterizó también por la presencia de fecas blandas, temblores musculares y secreciones nasales, e inapetencia, que se fueron haciendo menos pronunciados con las siguientes administraciones de LPS.

Efectos de la respuesta inflamatoria aguda sobre la disposición plasmática de florfenicol y florfenicol amina en ovinos posterior a la administración de florfenicol vía intravenosa.

La RIA inducida por la administración de LPS de *E. coli* en los ovinos del presente estudio causó modificaciones significativas en la disposición plasmática de FFC y su metabolito FFC-a luego de la administración de una dosis de 20 mg/kg de FFC vía IV.

El patrón de concentraciones plasmáticas de FFC observado en los ovinos control presentó una pendiente de disminución de concentraciones menos pronunciada y de decaimiento más paulatino en la fase de eliminación, respecto a las determinadas por Lobell *et al.* (1994), en bovinos sanos tratados con 20 mg/kg de FFC vía IV. Sin embargo, las concentraciones iniciales de 48,56 µg/mL de FFC a los 5 minutos, son similares a las

determinadas por dicho autor de 44,6 µg/mL. Jianzhong *et al.* (2004), evaluaron la farmacocinética de FFC en ovinos sanos posterior a la administración vía IV de 20 mg/kg, y se observó que los promedios de concentraciones iniciales de FFC del presente estudio son mayores a las concentraciones de 38,04 µg/mL, reportadas por estos autores.

En los ovinos tratados con LPS las concentraciones de FFC fueron mayores que las observadas en los ovinos control. Aunque ambos grupos presentan una fase inicial de distribución muy similar. Sin embargo, a contar de las 4 h aproximadamente, las concentraciones de antibiótico del grupo tratado con LPS comienzan a diferenciarse presentando una pendiente de disminución menos pronunciada respecto de las concentraciones del grupo control estableciendo un período de eliminación más prolongado.

Los promedios de $AUC_{0-\infty}$ de FFC en los ovinos del grupo control del presente estudio fueron de 76,5 µg* h/mL, valores que son similares a los promedios de AUC de 76,3 µg* h/mL reportados por Jianzhong *et al.* (2004) en ovinos. Por el contrario, son superiores a los descritos por Atef *et al.* (2001) en cabras tratadas con 20 mg/kg de FFC vía IV, cuyo AUC fue de 39,09 µg* h/mL. Estas diferencias pueden explicarse por el menor *clearance* obtenido en los ovinos del presente estudio, de 264,3 mL*h/kg, mientras que Atef *et al.* (2001) reportaron promedios de 550 mL*h/kg.

La respuesta inflamatoria inducida por LPS en los ovinos del presente estudio produjo incrementos significativos en los promedios de $AUC_{0-\infty}$ de FFC desde 76,5 µg* h/mL en los ovinos del grupo control hasta 98,4 µg* h/mL en los ovinos tratados con LPS. Estos

resultados se relacionan con las mayores concentraciones plasmáticas de FFC observadas en los ovinos tratados con LPS, respecto de las concentraciones observadas en los ovinos del grupo control. El incremento del AUC observado en los ovinos tratados con LPS, concuerda con los resultados descritos por Rao *et al.* (2000) en caprinos, en los que se observó un incremento significativo del $AUC_{0-\infty}$ de enrofloxacino desde 6,7 µg* h/mL en cabras control hasta 11,7 µg* h/mL en cabras tratadas con LPS. De manera similar, Waxman *et al.* (2003) reportaron la influencia del estado febril inducido por LPS de *E. coli* sobre la farmacocinética de marbofloxacino posterior a su administración IV en cabras en las que determinaron incrementos en el $AUC_{0-\infty}$ de marbofloxacino, desde 9,69 hasta 18,4 µg* h/mL en las cabras tratadas con LPS.

Los promedios de Vd_{ss} de FFC observados en los ovinos control del presente estudio, de 0,6 L, fueron similares a los obtenidos en ovinos por Lobell *et al.* (1994) de 0,4 L, y por Lane *et al.* (2004) de 0,5 L, también en ovinos. En cambio, estos valores de Vd_{ss} fueron inferiores a los reportados por Jianzhong *et al.* (2004) en ovinos donde se obtuvo Vd_{ss} de 1,86 L/kg. Estas diferencias en los promedios de Vd_{ss} pueden ser atribuidos a diferencias en el peso y contextura de los animales, también a diferencias en las dosificaciones y formulaciones de FFC utilizadas en cada estudio, además pueden influir diferencias en la duración de la persistencia del fármaco en el plasma, y en la tasa de metabolismo (Riviere, 1999; Trepanier, 2013).

En los ovinos tratados con LPS del presente estudio, a pesar de observarse incrementos en los promedios de Vd_{ss} de FFC respecto al grupo control, estos no fueron estadísticamente significativos. Los presentes resultados difieren de otros estudios que han obtenido diferencias en los promedios de Vd_{ss} como el de Kumar y Malik (2003) que

observaron disminución significativa del Vd_{ss} de oxitetraciclina en terneros cursando una RIA, con valores de 0,91 L/kg en el grupo control y 0,66 L/kg en el grupo tratado con LPS. Asimismo, Pijpers *et al.* (1990) describieron una disminución significativa del volumen de distribución de oxitetraciclina en cerdos cursando una infección experimental inducida por la inoculación endobronquial de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Las variaciones en el Vd_{ss} de fármacos en animales cursando una RIA pueden explicarse por la ocurrencia de alteraciones en la hidratación del organismo causadas por la respuesta inflamatoria, los que pueden causar cambios en el volumen de distribución de fármacos (Van Miert, 1990), y también pueden estar presentes factores hemodinámicos como depresión circulatoria como causa de disminución del Vd_{ss} de fármacos en animales en un estado febril (Abdullah y Baggot, 1986).

En los ovinos del grupo control se determinó un *clearance* de FFC de 0,264 L*h/kg, que es igual al promedio descrito por Jianzhong *et al.* (2004) para este parámetro, de 0,26 L*h/kg. En cambio, los promedios de *clearance* del presente estudio fueron mayores a los 0,17 L/kg/h reportados por Varma *et al.* (1986) en terneros tratados con 22 mg/kg de FFC vía IV.

En los ovinos cursando una RIA se observó disminución significativa de los promedios de *clearance* de FFC posterior a la administración IV de LPS observándose valores de 208,1 mL*h/kg en comparación a los 264,3 mL*h/kg del grupo control. De manera similar Waxman *et al.* (2003) y Rao *et al.* (2000), reportaron disminución del *clearance* de marbofloxacino, y de enrofloxacino, respectivamente, en cabras cursando una RIA inducida por LPS.

El TMR de FFC en los ovinos del grupo control presentó promedios de 1,10 h, los que son similares al TMR de 1,4 h obtenido por Lane *et al.* (2004), en ovinos sanos tratados con 40 mg/kg de FFC vía IV. Por el contrario, estos valores son inferiores a las 3,18 h descritos por Atef *et al.* (2001), en cabras tratadas con 20 mg/kg de FFC vía IV. En los ovinos tratados con LPS se observó una tendencia al incremento del TMR de FFC. De manera similar, Waxman *et al.* (2003) determinaron incrementos significativos en el TMR de marbofloxacino en cabras tratadas con LPS (6,09 h) en comparación con 5,28 h observado en el grupo control.

En la Tabla 30 se resumen los principales efectos de la RIA inducida por LPS sobre la farmacocinética de diferentes antibióticos administrados vía IV en rumiantes.

Los cambios inducidos por la RIA sobre los parámetros farmacocinéticos de FFC en el presente estudio en ovinos son similares a los descritos en estudios previos en los que evaluó el efecto de la RIA sobre la farmacocinética de antimicrobianos en rumiantes. No se determinaron cambios significativos sobre el Vd_{ss}, resultados que son similares a los descritos en caprinos por Rao *et al.* (2000) que se puede atribuir al hecho de que fármacos muy liposolubles como son FFC y enrofloxacino, poseen un amplio Vd, por lo que es menos probable que la RIA inducida por bajas dosis de LPS produzca cambios significativos sobre este parámetro. En terneros endotoxémicos tratados con oxitetraciclina (Kumar y Malik (2003) y en cabras endotoxémicas tratadas con marbofloxacino (Waxman *et al.,* 2003) se observó disminución del Vd_{ss} lo cual puede deberse a características fisicoquímicas del fármaco y a alteraciones hemodinámicas que pueden presentarse en una respuesta inflamatoria aguda como son disminución del gasto cardíaco y de la presión vascular sistémica, asociado a depresión circulatoria que

puede modificar la distribución del flujo sanguíneo a los diferentes órganos (Abdullah y Baggot, 1986).

En los estudios analizados se observó disminución del *clearance* de los distintos antibióticos a excepción del estudio de Kumar y Malik (2003) en terneros en el cual no se determinaron cambios significativos en los valores de *clearance* de oxitetraciclina, diferencias que pueden atribuirse al modelo experimental y frecuencia de LPS utilizada, y a las características fisicoquímicas del antibiótico.

Tabla 30. Efectos de la respuesta inflamatoria aguda inducida por LPS sobre parámetros farmacocinéticos de diferentes antibióticos administrados vía IV en rumiantes.

Especie	**Fármaco**	**Cambios en parámetros farmacocinéticos**	**Referencia**
Ovinos	Florfenicol	Disminución *clearance,* aumento AUC y TMR. Vd_{ss} y $t_{1/2el}$ sin cambios significativos.	Resultados del presente estudio.
Cabras	Norfloxacino	Disminución *clearance*, incremento AUC. $t_{1/2el}$ y TMR sin cambios significativos.	Jha *et al.* (1996)
Cabras	Enrofloxacino	Disminución *clearance,* aumento AUC, TMR y $t_{1/2el}$. Vd_{ss} sin cambios significativos.	Rao *et al.* (2000)
Cabras	Marbofloxacino	Disminución *clearance y* Vd_{ss}, aumento AUC y TMR. $t_{1/2el}$ sin cambios significativos.	Waxman *et al.* (2003)
Terneros	Oxitetraciclina	Disminución Vd_{ss} y $t_{1/2el}$. AUC y *clearance* sin cambios significativos.	Kumar y Malik (2003)

$t_{1/2}$: vida media de eliminación; AUC: área bajo la curva; TMR: Tiempo medio de residencia, Vd_{ss}: Volumen de distribución en estado de equilibrio. Fuente: Elaboración propia.

En resumen, se evidenció que la RIA inducida por LPS de *E. coli* en los ovinos tratados con FFC vía IV del presente estudio originó cambios significativos en los parámetros farmacocinéticos de FFC, como disminución significativa del *clearance,* que se asoció a

incrementos en las concentraciones plasmáticas y a aumento en el área bajo la curva y en el tiempo medio de residencia de FFC.

Como causa de la disminución del *clearance* de FFC en los ovinos tratados con LPS se atribuyen alteraciones en los procesos de biotransformación hepática y excreción renal inducidos por la RIA (Monshouwer *et al.,* 1996; Walter *et al.,* 2016). Considerando los incrementos significativos de urea y creatinina observados en los ovinos tratados con LPS, es más probable la ocurrencia de alteraciones renales, junto con posibles alteraciones hemodinámicas en los ovinos que cursaron con una RIA (Chvojka *et al.,* 2010).

El grado en el cual la alteración de la función renal afecte la eliminación del fármaco dependerá de la fracción que es excretada normalmente como fármaco activo (Baggot, 2001). En rumiantes se ha reportado que FFC es eliminado en gran proporción vía renal, reportándose en bovinos que más del 60% es excretado como fármaco primario sin metabolizar en la orina (Varma *et al.,* 1986).

Los promedios de $C_{máx}$ y AUC_{0-t} de FFC-a observados posterior a la administración IV de FFC en los ovinos del grupo control fueron de 0,67 µg/mL y 4 µg* h/mL, respectivamente, los que son inferiores a los promedios de $C_{máx}$ de 2,9 µg/mL y AUC_{0-t} de 18,4 µg* h/mL descritos en anterior estudio de nuestro laboratorio en ovinos tratados con 20 mg/kg vía IV (Palma *et al.,* 2011). Estas diferencias se pueden atribuir al mayor AUC_{0-t} de FFC observado en dicho estudio, que fue de 145,6 µg* h/mL.

En los ovinos control, los promedios de TMR de FFC-a de 6,7 h fueron menores a los TMR de 18, 1 h reportados por Palma *et al.* (2011).

Respecto a los efectos de la RIA sobre la disposición plasmática de FFC-a, se observó un leve incremento de las concentraciones plasmáticas de FFC-a en los ovinos tratados con LPS, en comparación con las concentraciones observadas en los ovinos del grupo control. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas entre ambos grupos experimentales. El porcentaje de la relación de metabolito/FFC tanto en los ovinos control como en los tratados con LPS, fue muy similar, alcanzando valores de 5,6 % en los ovinos control y de 5,4 % en los ovinos tratados con LPS. Estos resultados demuestran que en la especie ovina FFC experimenta un bajo grado de biotransformación. Considerando las bajas concentraciones de FFC-a observadas en los ovinos tratados con LPS, es posible pensar que la disminución del *clearance* de este antibiótico está más relacionada con la disminución en la excreción renal del fármaco, y que la RIA inducida por LPS no modifica en forma significativa el metabolismo de FFC.

Estos resultados concuerdan con el bajo nivel de metabolismo hepático que ha sido descrito en rumiantes en comparación con monogástricos, donde se ha observado menor contenido de CYP450 en bovinos respecto a conejos (Nebbia *et al.,* 2003).

Efectos de la respuesta inflamatoria aguda sobre la disposición plasmática de florfenicol y florfenicol amina en ovinos posterior a la administración de florfenicol vía intramuscular.

Los resultados del presente estudio demuestran que la RIA inducida por la administración de tres dosis de LPS de 1 µg/kg en ovinos causó cambios en la disposición plasmática de FFC y FFC-a, luego de la administración del antibiótico vía IM.

Las concentraciones plasmáticas de FFC en los ovinos control, posterior a su administración vía IM, presentaron valores de 4,3 µg/mL a las 1,5 h y de 2,5 µg/mL, a las 4 h posterior al tratamiento con FFC. Estos valores son inferiores a los promedios obtenidos por Adams *et al.* (1987) en terneros tratados con 11 mg/kg de FFC vía oral, a las 4 h post administración, que fueron de 5 µg/mL. Estas diferencias de concentraciones se explican debido a la diferente dosificación de FFC que fue administrada en los terneros cada 12 h por 7 dosis en el estudio de Adams *et al.* (1987).

Los promedios de $C_{máx}$ de FFC en los ovinos control del presente estudio fueron de 4,98 µg/mL, y concuerdan con los valores de $C_{máx}$ de FFC de 3,76 µg/mL, descritos por Balcomb *et al.* (2018) en ovinos tratados con 20 mg/kg de FFC vía IM en una formulación de 300 mg/mL con el excipiente N-metil- 2- pirrolidona. También son similares a los valores de $C_{máx}$ de 4,13 µg/mL de FFC observados por Jianzhong *et al.* (2004) en ovinos, posterior a la administración de 20 mg/kg de FFC vía IM. Promedios de $C_{máx}$ menores a los obtenidos en el presente estudio se han descrito en llamas tratadas con 20 mg/kg del antibiótico obteniéndose valores de $C_{máx}$ de 3,2 µg/mL (Pentecost *et al.,* 2013). Estas diferencias en los valores de $C_{máx}$ observados entre los distintos estudios pueden atribuirse a diferencias en las formulaciones y dosificaciones de FFC utilizadas. También a diferencias en el proceso de absorción del antibiótico, como irrigación sanguínea en el sitio de inyección que pueden determinar la magnitud de las concentraciones plasmáticas alcanzadas.

Los promedios de área bajo la curva (AUC_{0-t}) de FFC fueron de 12,8 µg* h/mL, y son menores a los descritos por Balcomb *et al.* (2018), de 24,8 µg* h/mL. De manera similar son menores al AUC de 51, 83 µg* h/mL, obtenidos por Holmes *et al.* (2011) en alpacas

tratadas con 20 mg/kg de FFC vía IM. Estas diferencias se explican por el mayor tiempo de muestreo considerado en ambos estudios.

Los promedios de AUC_{0-t} fueron significativamente mayores en los ovinos tratados con LPS respecto de los ovinos control. Beovic *et al.* (1999) determinaron la influencia de la enfermedad febril aguda sobre la farmacocinética de cefazolina en pacientes humanos. Se determinó que en el período febril los valores de $AUC_{0-\infty}$ y $C_{máx}$ fueron más elevados que en el período de defervescencia. Resultados similares han sido descritos por Jha *et al.* (1996), en cabras tratadas con dosis repetidas de LPS de *E. coli* en las que se administró norfloxacino vía IV. Se determinó un aumento significativo del AUC de norfloxacino en los animales tratados con LPS en comparación a los animales control, lo que es coincidente con lo observado en el presente estudio.

En los ovinos control los valores de $C_{máx}$ y AUC_{0-t} de FFC-a de 0,17 µg/mL y 0,44 µg* h/mL, respectivamente fueron menores a los promedios de $C_{máx}$ de 2,9 µg/mL y 18,4 µg* h/mL, reportados por Palma *et al.* (2011), en estudio anterior de nuestro laboratorio realizado en ovinos sanos, tratados con 20 mg/kg de FFC vía IV. El promedio de la relación AUC FFC-a/AUC FFC (MR%) del presente estudio fue de 4,0 %, valor que es menor al 14% descrito por Palma *et al.* (2011) en ovinos sanos. Diferencias en la vía de administración de FFC y en los tiempos de muestreo explican estas diferencias.

En los ovinos tratados con LPS los promedios de $C_{máx}$ y AUC_{0-t} de FFC-a fueron significativamente mayores a los observados en los animales control. Las concentraciones de FFC-a y el tiempo en que se alcanzan las concentraciones máximas de FFC-a es mayor, por lo tanto, la RIA inducida por LPS retarda el metabolismo de FFC.

En los ovinos tratados con LPS, la RIA causó cambios en los valores de $C_{máx}$ y en la vida media de distribución de FFC, parámetros que mostraron una tendencia ($p< 0,1$) a ser mayores a los observados en los ovinos control. Asimismo, el AUC_{0-t} de FFC y AUC_{0-t} de FFC-a fueron significativamente mayores en los ovinos tratados con LPS respecto a los animales del grupo control. Estas variaciones de los parámetros farmacocinéticos de FFC y FFC-a pueden deberse a alteraciones hemodinámicas causadas por la RIA, donde se ha descrito que pueden ocurrir modificaciones a nivel renal, como cambios en el flujo sanguíneo (Gupta *et al.,* 2007) y disminución de la excreción del antibiótico.

Efectos de la respuesta inflamatoria aguda sobre la distribución tisular de florfenicol y florfenicol amina en ovinos.

En los ovinos control las mayores concentraciones de FFC se observaron en riñón (5,96 µg/g), seguidas en orden decreciente por músculo (3,10 µg/g), bazo (1,86 µg/g), pulmón (0,85 µg/g), cerebro (0,35 µg/g) e hígado (0,30 µg/g).

Se observó una distribución diferencial del antibiótico en los tejidos, en la cual las concentraciones notoriamente más altas de FFC se observaron en riñón, lo que se explica por ser este el principal sitio de excreción del antibiótico (Varma *et al.,* 1986). En cambio, las más bajas concentraciones de FFC a nivel de hígado indican que se produjo un rápido metabolismo de FFC hacia FFC-a cuyas concentraciones en hígado fueron mayores a las de FFC.

Adams *et al.* (1987) determinaron concentraciones tisulares de FFC en terneros tratados con 7 administraciones de 11 mg/kg de FFC cada 12 h, vía oral. A las 4 h se observaron las mayores concentraciones de FFC en tejidos, determinándose altas concentraciones

de FFC en orina, riñón, y en bilis. En los ovinos del presente estudio las concentraciones de FFC determinadas en hígado, riñón, músculo, pulmón, bazo y cerebro fueron menores a las concentraciones determinadas en aquel estudio. Estas diferencias pueden deberse a las distintas dosificaciones y formulaciones administradas del antibiótico, diferencias en los volúmenes de distribución, en la contextura de los animales, o en irrigación sanguínea, los que determinan la distribución tisular de un fármaco.

En los ovinos tratados con LPS las concentraciones tisulares de FFC fueron significativamente más altas en tejidos como riñón (9,72 µg/g), bazo (3,09 µg/g) y cerebro (0,73 µg/g), respecto de las concentraciones observadas en el grupo control.

Se ha descrito que en presencia de una condición febril pueden producirse variaciones en la distribución de los fármacos. Estos cambios pueden deberse a factores propios del fármaco como características fisicoquímicas y grado de liposolubilidad, o a factores propios del animal como pH de los tejidos, permeabilidad de membranas y distribución del flujo sanguíneo a los tejidos (Van Miert, 1990). Al respecto se ha reportado que en presencia de inflamación o infección pueden ocurrir variaciones de pH tisular lo cual puede ocasionar el atrapamiento iónico del fármaco en ciertos tejidos con incremento de concentraciones tisulares (Martínez *et al.,* 2020).

También están presentes modificaciones como incremento de la permeabilidad vascular con salida de fluido hacia el intersticio tisular, incremento de la capacitancia venosa y acumulo de sangre venosa (Van Miert 1990, Martínez *et al.,* 2020), modificándose la permeabilidad capilar y microcirculación de los tejidos (Codina y Zeitlinger, 2022).

El bajo porcentaje de unión a proteínas plasmáticas que posee FFC explica la amplia distribución de este antibiótico hacia los diferentes tejidos del organismo (Bretzlaff *et al.*,1987) y los factores mencionados que modifican la distribución tisular en la RIA explican el incremento observado de las concentraciones tisulares de FFC en los ovinos tratados con LPS.

En los ovinos tratados con LPS se produjo un incremento de las concentraciones de FFC a nivel de cerebro respecto a las concentraciones observadas en los ovinos control, lo que sugiere que la RIA pudo modificar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica facilitando el traspaso del antibiótico hacia el encéfalo. Es posible considerar esta posibilidad tomando en cuenta las características de FFC de ser un antibiótico altamente lipofílico, con bajo peso molecular y estable en un amplio rango de pH (Gutiérrez *et al.,* 2022). Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado en ratones donde la administración sistémica de LPS incrementó la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al antibiótico colistina (Jin *et al.,* 2011). Sumado a esto, De Craene *et al.* (1997) reportaron concentraciones terapéuticas de FFC en cerebro de terneros tratados con dosis de 20 mg/kg de FFC, similar a la administrada en los ovinos del presente estudio.

Las concentraciones de FFC alcanzadas en pulmón fueron de 0,85 µg/g en los ovinos control, y de 1,1 µg/g en los ovinos tratados con LPS. Estas concentraciones son superiores a los valores de MIC_{90} de 0,5 µg/mL que han sido descritas en ovinos para *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida,* que son los microorganismos patógenos más comunes reportados en infecciones del tracto respiratorio en esta especie (Berge *et al.* 2006). En consecuencia, la administración de una dosis de FFC de

20 mg/kg vía IM permite alcanzar concentraciones terapéuticas a nivel pulmonar en ovinos.

Respecto a las concentraciones tisulares de FFC-a, en los ovinos control las mayores concentraciones se observaron en riñón (2,83 µg/g), seguido en forma decreciente por hígado (1,48 µg/g), bazo (0,52 µg/g), músculo (0,50 µg/g), pulmón (0,41 µg/g), y cerebro (0,22 µg/g). En el grupo tratado con LPS las concentraciones tisulares de FFC-a mostraron una tendencia a ser significativamente más altas en riñón (4,79 µg/g; p = 0,089), hígado (2,99 µg/g; p = 0,0652) y músculo (0,76 µg/g; p = 0,067); mientras que en pulmón fueron significativamente mayores ($p< 0,05$) que en el grupo control (1,13 µg/g). Por lo tanto, la RIA modificó significativamente las concentraciones tisulares de FFC-a en ovinos.

Las concentraciones de FFC-a a nivel de hígado fueron superiores a las concentraciones de FFC en este mismo órgano, resultados que indican que a nivel hepático FFC es rápidamente metabolizado a FFC-a. El incremento de las concentraciones hepáticas de FFC-a en los ovinos tratados con LPS en comparación con los ovinos control se contrapone con el efecto inhibidor del metabolismo hepático descrito para la RIA. Sin embargo, el aumento de estas concentraciones de FFC-a a nivel hepático asociado al mayor valor de AUC de metabolito que fue observado en los ovinos tratados con LPS, puede atribuirse a los cambios hemodinámicos inducidos por la RIA que modifican el flujo sanguíneo hepático y renal y disminuir la eliminación del antimicrobiano y su metabolito (Van Miert, 1990). Considerando, además, que en los ovinos tratados con LPS se observaron incrementos significativos de las concentraciones de urea y creatinina que demuestran que la respuesta inflamatoria aguda produjo modificaciones

en la funcionalidad renal, lo cual podría disminuir la excreción renal de FFC y FFC-a, y explicaría el aumento en las concentraciones en sangre y tejidos de estos compuestos.

3. Comparación de la disposición plasmática y distribución tisular de florfenicol y florfenicol amina, entre conejos y ovinos, posterior a la administración de florfenicol en animales sanos.

La comparación de los resultados obtenidos sobre la disposición plasmática y distribución tisular de FFC y FFC-a en los animales del grupo control de ambas especies demuestran que existen diferencias significativas entre conejos y ovinos en términos de la distribución y eliminación tanto del fármaco como de su principal metabolito. Resultados que indican que existen diferencias de especie que influyen en el desarrollo de los procesos farmacocinéticos (Baggot, 2001).

Posterior a la inyección IV de una dosis de 20 mg/kg de FFC en ambas especies, se observó que, al comparar las curvas de concentraciones plasmáticas de FFC en el tiempo, en ovinos existe una mayor persistencia de las concentraciones del antibiótico en comparación a las concentraciones observadas en conejos. La menor persistencia de las concentraciones de FFC en conejos se deben a un mayor *clearance* del fármaco respecto de los ovinos. El mayor *clearance* obtenido en los conejos se relaciona con el menor promedio de las variables AUC, $t_{1/2el}$ y TMR observados respecto de los ovinos. El menor *clearance* determinado en ovinos respecto a los conejos, indica que FFC es excretado más lentamente en esta especie.

El Vd_{ss} también fue mayor en los conejos en comparación con los ovinos, y con un alto valor de 1,4 L lo que representa la mayor difusión del fármaco hacia los diferentes tejidos en conejos.

Al comparar las concentraciones plasmáticas de FFC-a entre ambas especies, posterior a la administración de FFC vía IV, en los conejos se observaron mayores concentraciones del metabolito, en comparación con los ovinos, con notorias diferencias en la fase inicial de formación del metabolito. Las mayores concentraciones plasmáticas de FFC-a observadas en los conejos determinan que los promedios de $C_{Máx}$ y AUC_{0-t} de FFC-a obtenido en esta especie sean mayores a los observados en ovinos. Estos resultados indican que en conejos hay una mayor biotransformación de FFC hacia su metabolito FFC-a y es concordante con el 57,6 % de MR% de FFC-a mientras que en ovinos el MR% fue de 5,6%, es decir, 10 veces inferior. Estos resultados demuestran la mayor actividad metabólica biotransformadora de FFC presente en los lagomorfos en comparación con los rumiantes. Esto es indicativo de diferencias de especie en los sistemas enzimáticos que metabolizan fármacos en particular el CYP450. Se han reportado diferencias en el sistema CYP450 de metabolización hepática entre diferentes especies animales (Nebbia *et al.,* 2003; Toutain *et al.,* 2010). Dalvi *et al.* (1987) observaron diferencias significativas entre ovinos y conejos en cuanto a cantidad de CYP450 a nivel de microsomas hepáticos y en la actividad de tipo benzfetamina N-desmetilasa, propia de CYP2B, con valores de actividad más altos en conejos. Nebbia *et al.* (2003) midieron diferencias en cantidad de CYP450 y en actividad enzimática microsomal entre especies productoras de carne como bovinos, cerdos y conejos. Se determinaron diferencias significativas en la actividad benzfetamina N-desmetilasa, con

valores significativamente más elevados en conejos que en bovinos. También diferencias en la actividad metoxiresorufin-desmetilasa propia de la subfamilia CYP1A, los que fueron más elevados en conejos que en rumiantes. Asimismo, la actividad eritromicin-N-demetilasa propia de CYP3A, fue más elevada en conejos, en comparación con la actividad hepática en equinos, bovinos o cerdos. En cambio, fue similar a la actividad reportada en ratas para esta subfamilia. Se observó también mayor contenido de CYP450 en conejos respecto a bovinos (Nebbia *et al.,* 2003).

Considerando los antecedentes reportados de evidencia de la participación de la subfamilia CYP3A en el metabolismo de FFC en conejos (Liu *et al*., 2011), es posible que las altas concentraciones de FFC-a observadas en esta especie sean debido a un mayor nivel de actividad en su sistema enzimático microsomal hepático.

Respecto a la distribución tisular de FFC, en todos los tejidos analizados se observaron concentraciones más elevadas de FFC en los tejidos de conejos, en comparación con los observados en ovinos, siendo estas diferencias estadísticamente significativas para las concentraciones observadas en hígado, pulmón, bazo y cerebro. Estos resultados concuerdan con la relación T/P más elevada en los conejos respecto a los ovinos, para los mismos tejidos y concuerdan con el mayor Vd_{ss} observado en los conejos.

Respecto a las concentraciones tisulares de FFC-a, estas fueron significativamente más altas en conejos respecto de los ovinos. Las concentraciones de FFC-a en el hígado de conejos fueron mayores a las concentraciones observadas en ovinos, lo que indica que en conejos se produce una rápida biotransformación de FFC hacia su metabolito FFC-a, a nivel hepático y es concordante con el mayor valor de *clearance* obtenido para esta

especie. Según lo esperado, en ambas especies las mayores concentraciones de FFC y FFC-a se localizaron a nivel renal, por ser este el sitio principal de excreción del antibiótico y su metabolito (Varma *et al.,* 1986).

Por lo tanto, los resultados demuestran que existen diferencias respecto a la actividad enzimática de los sistemas metabolizantes hepáticos entre ambas especies, factor que debe tenerse presente cuando se establezcan las dosis y frecuencia de administración de este antibiótico en animales monogástricos (conejos) y rumiantes (ovinos). Los resultados obtenidos sugieren que debido a las características farmacocinéticas observadas en conejo puede ser necesaria una tasa de administración de FFC más frecuente.

4. Determinación de diferencias de especie en los cambios de disposición plasmática de florfenicol y florfenicol amina inducidos por la administración del lipopolisacárido de *E. coli* en conejos y ovinos.

En este objetivo se estudiaron las posibles diferencias de especie que pueden estar presentes en los animales bajo los efectos de la respuesta inflamatoria aguda inducida por el LPS de *E. coli* sobre la farmacocinética de FFC y FFC-a en ovinos y conejos. Para evaluarlo se calcularon diferencias entre grupo tratado y grupo control, expresadas como porcentaje de cambio (Δ%), para los parámetros farmacocinéticos de FFC y FFC-a. Para calcular este delta se consideraron los parámetros farmacocinéticos de FFC y FFC-a obtenidos posterior a la administración vía IV de una dosis de 20 mg/kg de FFC.

El porcentaje de cambio fue calculado mediante la siguiente fórmula:

Porcentaje de cambio (Δ%) = ((Valor LPS – Valor Control) /Valor Control) x100.

Se utilizó la vía IV para comparar los deltas de parámetros farmacocinéticos obtenidos en ambas especies con el fin de excluir la influencia del proceso de absorción sobre los parámetros farmacocinéticos durante los procesos de distribución y eliminación del fármaco.

No se determinaron diferencias significativas para los promedios de porcentaje de cambio de los parámetros farmacocinéticos de FFC entre conejos y ovinos, lo que implica que el efecto de la respuesta inflamatoria aguda inducida por el LPS de *E. coli* afecta de manera similar a ambas especies. En conejos y ovinos se observó que la administración de LPS produjo incrementos significativos de los parámetros de AUC, $t_{1/2}$, TMR, Vd_{ss}, mientras que la RIA inducida por LPS produjo disminución del *clearance* de FFC.

Por otra parte, respecto a los parámetros farmacocinéticos del metabolito FFC-a se observaron diferencias significativas para los parámetros de $\Delta C_{Máx}$ (%), ΔAUC_{0-t} (%), $\Delta AUC_{0-\infty}$ (%), y ΔMR (%) entre los deltas de porcentaje de cambio entre conejos y ovinos. Estos presentaron una disminución significativa en los conejos en comparación con los ovinos.

Respecto al ΔMR (%), se observaron diferencias significativas entre ambas especies causadas por la RIA. En los conejos, el MR% disminuyó de 57,6 % en el grupo control a 22,0 % en el grupo LPS, lo cual representa una disminución de un 62,4 % del MR% en los conejos. En cambio, en los ovinos, no hubo cambios respecto al MR% obtenido en

los ovinos control y LPS, siendo muy similares los promedios de MR% entre ambos grupos.

Se describe que los efectos de un estado inflamatorio o febril sobre la farmacocinética de fármacos pueden ser variados y estas diferencias pueden depender tanto de la especie animal como también de las características fisicoquímicas de cada fármaco (Kumar y Malik, 2003; Martínez *et al.,* 2020). Lo anterior se evidenció en diferencias de especie sobre la farmacocinética del metabolito FFC-a. Estas variaciones estarían dadas principalmente por diferencias en el metabolismo hepático y también posiblemente por diferencias en la excreción renal del metabolito entre ambas especies.

Frente a los antecedentes expuestos es importante considerar la importancia del estudio de la farmacocinética de antibióticos en animales que cursan con enfermedad infecciosa o febril o, como en el presente estudio, en un modelo experimental que simula las condiciones de una infección o inflamación, lo cual entrega antecedentes clínicos de utilidad para la estimación de dosificaciones óptimas en presencia de infección para mantener la eficacia de un antibiótico (Kumar y Malik, 2003; Toutain *et al.*, 2010, Martínez *et al.,* 2020).

VIII. COMENTARIOS FINALES.

La respuesta inflamatoria aguda inducida por la administración de LPS permite reproducir las condiciones fisiopatológicas de un cuadro infeccioso bacteriano de baja intensidad y corta duración (Post *et al.,* 2003), el cual permite estudiar los efectos de la inflamación aguda sistémica sobre los procesos farmacocinéticos de distintos fármacos, incluyendo nuevas opciones terapéuticas (Monshouwer *et al*., 1996; Buras *et al.,* 2005). El LPS estimula la liberación de mediadores inflamatorios de diferentes tipos celulares, que son responsables de iniciar el proceso de sepsis (Poli-de-Figueiredo *et al.,* 2008). Por lo tanto, la administración de LPS en animales se utiliza comúnmente como modelo de sepsis o septicemia, tratando de replican las condiciones iniciales de una infección bacteriana (Post *et al.,* 2003). Este modelo presenta ventajas como ser fácilmente reproducible a nivel experimental estableciéndose en condiciones controladas, y permite replicar las condiciones fisiopatológicas presentes de forma natural que ocurren en un proceso infeccioso (Monshouwer *et al.,* 1996; Post *et al.,* 2003; Poli-de-Figueiredo *et al*., 2008). Además, se ha observado diferente grado de sensibilidad a LPS entre distintas especies animales, siendo los roedores más resistentes, mientras que los conejos, rumiantes y seres humanos presentan mayor sensibilidad a la endotoxina (Poli-de-Figueiredo *et al.*, 2008; Brinkworth y Valizadegan, 2021).

En el presente estudio, se establecieron dos modelos animales de inflamación aguda sistémica, mediante la administración de tres dosis bajas de LPS de *E. coli* en conejos y ovinos. La respuesta inflamatoria aguda generada por el LPS de *E. coli* en ambas especies se caracterizó por la reversibilidad de los cambios sobre los diferentes parámetros fisiológicos evaluados. En general los parámetros retornaron a los valores

basales dentro de 24 h, de manera similar a lo descrito en otros estudios como el de Post *et al*. (2003). Otro estudio de nuestro laboratorio realizado en conejos tratados con LPS, determinó que tanto la temperatura corporal y el recuento de leucocitos totales retornaron a valores basales dentro de las 12 h posterior a la administración de LPS (Cazanga *et al.,* 2023). Además, los diferentes signos y síntomas observados en los animales como decaimiento, fecas blandas e inapetencia fueron revertidos dentro de 24 h posterior a la primera administración de LPS.

Se demostró que la respuesta inflamatoria aguda inducida por el LPS modificó de manera significativa la farmacocinética de FFC y de su metabolito FFC-a, así como también, la distribución tisular de los dos compuestos en ambas especies. Estos resultados son relevantes de tener en consideración para los cálculos de regímenes de dosificación de este antibiótico, ya que al administrar FFC en un animal cursando una infección con componente inflamatorio los niveles plasmáticos del antibiótico probablemente se vean incrementados modificando sus parámetros farmacocinéticos.

Considerando los incrementos observados de concentraciones plasmáticas y tisulares del antibiótico en los animales cursando una RIA, este incremento puede ser beneficioso para la eficacia terapéutica del antibiótico, según lo que fue observado en las concentraciones de FFC en pulmón de ovinos tratados con LPS, las cuales fueron mayores a las MIC para principales microorganismos patógenos causantes de infecciones respiratorias en esta especie. En conejos esto fue determinado por la obtención de los índices PK/PD, considerando el mayor tiempo de muestreo realizado en esta especie.

En conejos, en base a los cálculos PK/PD realizados, se observó una eficacia de FFC óptima y de acuerdo a lo esperado considerando los valores de MIC en el rango inferior (0,25 -0,5 µg/mL) para los microorganismos patógenos que afectan comúnmente a conejos; *Bordetella bronchiseptica* y *Pasteurella multocida*, sin embargo, los índices PK/PD obtenidos para los valores superiores de MIC (1-2 µg/mL) no alcanzaron una eficacia ideal, y considerando la menor persistencia de concentraciones de FFC observada en conejos, respecto de ovinos, para alcanzar resultados óptimos de eficacia, pudiera ser necesaria una frecuencia de administración mayor de FFC al ser administrado en conejos.

Respecto a los efectos fisiopatológicos de la RIA que fueron observados en los animales del estudio, y que explican las modificaciones en la farmacocinética y distribución tisular de FFC y su metabolito, es probable que en conejos la disminución del *clearance* de FFC se deba en parte a una inhibición del metabolismo de FFC mediado por el sistema CYP450, debido a la disminución del AUC de FFC-a y del MR% observada en los conejos tratados con LPS. A pesar de que, en análisis qPCR realizados en tejido hepático de conejos tratados con FFC vía IM del presente estudio no se observaron diferencias en la expresión génica relativa de mRNA de CYP3A6 entre conejos control y conejos tratados con LPS (Resultados presentados en Anexo), esto puede deberse a otros factores como el tiempo de muestreo, el que fue a las 12 h, siendo posible que aquellos cambios en la expresión del CYP450 se evidencien de manera más tardía, a las 24 h posterior a la administración de LPS, como ha sido demostrado por autores como Saitoh et al. (1999) y Lee et al., (2008). Por lo tanto, se requerirían estudios adicionales para dilucidar estas hipótesis.

En los ovinos, debido al bajo metabolismo hepático de FFC reflejado por las bajas concentraciones y MR% de FFC-a obtenidos, es probable que los cambios inducidos por la RIA sobre la disminución del *clearance* de FFC se reflejen mayormente en la disminución de la excreción renal de FFC, lo que fue demostrado por incremento del AUC de FFC, y alteraciones de parámetros bioquímicos como fue el aumento de concentraciones de urea y creatinina.

En ovinos las perspectivas terapéuticas de FFC a partir de los resultados generados en el presente estudio permiten aseverar que este antibiótico posee eficacia terapéutica adecuada para el tratamiento de infecciones bacterianas pulmonares, ya que las concentraciones del antibiótico a nivel pulmonar fueron superiores a las MIC para los principales microorganismos patógenos que afectan a ovinos.

De esta manera, es posible inferir que FFC es un antibiótico con numerosas ventajas, como poseer bajo nivel de toxicidad, con posibilidades de ser aplicado en diversas enfermedades, sumado a que el nivel de resistencia generada para él aún no es tan elevado, siendo menor comparado a otros antibióticos (Lei *et al.,* 2018; Lu *et al.,* 2018). Esto lo hace conveniente de continuar su utilización en medicina veterinaria, y considerar su aplicación en conejos, además de rumiantes, resguardando el uso de dosificaciones óptimas para evitar el incremento de resistencia bacteriana.

Asimismo, los resultados obtenidos demuestran que existen importantes diferencias de especie en la farmacocinética de FFC y FFC-a, que evidencian distinta actividad metabolizadora hepática de fármacos entre ambas especies animales, lo cual debe

tenerse presente para establecer dosis y frecuencia de administración de FFC en animales monogástricos, como conejos y rumiantes, como ovinos.

Finalmente, los resultados obtenidos permiten comprobar la hipótesis planteada en este estudio, ya que la RIA inducida por la administración de LPS produjo modificaciones significativas en la disposición plasmática y distribución tisular de FFC y su metabolito FFC-a en conejos y ovinos, evidenciándose a través del incremento de las concentraciones plasmáticas y tisulares de FFC en los animales tratados con LPS en comparación con los efectos observados en animales sanos. Asimismo, se determinaron diferencias de especie originadas por la RIA inducida mediante la administración de LPS de *E. coli*, sobre las modificaciones de la disposición plasmática de FFC-a.

IX. CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos planteados, y según los resultados obtenidos en esta investigación, se plantean las siguientes conclusiones:

Resultados en conejos:

1A. La respuesta inflamatoria aguda inducida por la administración de tres dosis de LPS de *E. coli* modificó significativamente la disposición plasmática de FFC y su metabolito FFC-a, en los conejos del presente estudio. Estos cambios se caracterizaron por incrementos de las concentraciones plasmáticas de FFC, asociadas con una disminución significativa del *clearance* de FFC, el cual generó en consecuencia, incrementos en el AUC y $t_{1/2}$ del antibiótico. Además, se observó inhibición del metabolismo de FFC en los conejos tratados con LPS lo que fue evidenciado por una disminución significativa del MR% y del AUC de FFC-a.

2A. La respuesta inflamatoria aguda inducida por la administración de LPS de *E. coli*, modificó la distribución tisular de FFC y FFC-a en los conejos del estudio, observándose incrementos significativos de las concentraciones de FFC en músculo y en las concentraciones del metabolito FFC-a en hígado, músculo y bazo.

Resultados en ovinos:

1B. La respuesta inflamatoria aguda inducida por la administración de tres dosis de LPS de *E. coli* modificó significativamente la disposición plasmática de FFC y su

metabolito FFC-a en ovinos. Se observaron incrementos de las concentraciones plasmáticas de FFC, junto con disminución significativa del *clearance,* el que se asocia a incrementos significativos en el AUC y TMR de FFC. También se observaron incrementos significativos del AUC_{0-t} de FFC-a, los que son originados por alteraciones en la funcionalidad renal causadas por la RIA.

2B. La respuesta inflamatoria aguda inducida por la administración de LPS de *E. coli*, modificó la distribución tisular de FFC y FFC-a en los ovinos del estudio. En los ovinos tratados con LPS se determinaron incrementos significativos de las concentraciones de FFC en riñón, bazo y cerebro, mientras que se observaron incrementos significativos de las concentraciones de FFC-a en pulmón.

Comparación entre especies

3. Se determinaron diferencias de especie entre ovinos y conejos sanos, tanto en la disposición plasmática y distribución tisular de FFC y FFC-a. Las diferencias en la disposición plasmática se observaron en las fases de distribución y eliminación del antibiótico y su metabolito, donde se determinaron mayores promedios de Vd_{ss} y *clearance* de FFC en conejos respecto de los ovinos. También el MR% de FFC-a fue significativamente mayor en conejos respecto a los ovinos, lo que demuestra una mayor biotransformación de FFC en esta especie. Se observaron mayores concentraciones tisulares de FFC y su metabolito en conejos respecto de los ovinos.

4. Se determinaron diferencias de especie en los cambios de disposición plasmática del metabolito FFC-a causados por la RIA inducida por la administración del lipopolisacárido de *E. coli,* entre conejos y ovinos.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdullah, A., and Baggot, J. D. (1986). Influence of induced disease states on the disposition kinetics of imidocarb in goats. J. Vet. Pharmacol. Therap. 9: 192–197.

2. Abushaheen, M. A., Muzaheed, Fatani, A. J., Alosaimi, M., Mansy, W., George, M., Acharya, S., Rathod, S., Divakar, D. D., Jhugroo, C., Vellappally, S., Khan, A. A., Shaik, J., & Jhugroo, P. (2020). Antimicrobial resistance, mechanisms, and its clinical significance. Disease-a-Month. 66:100971.

3. Adams, P.E., Varma, K.J., Powers, T.E. and Lamendola, J.F. (1987). Tissue concentrations and pharmacokinetics of florfenicol in male veal calves given repeated doses. Am. J. Vet. Res. 48: 1725-1732.

4. Aderem, A. and Ulevitch, R. J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. Nature, 406: 782-787.

5. Afifi, N. A. and El-Sooud, K. A. (1997). Tissue concentrations and pharmacokinetics of florfenicol in broiler chickens. Br. Poult. Sci. 38: 425-428.

6. Ahmad, I., Huang, L., Hao, H., Sanders, P., and Yuan, Z. (2016). Application of PK/PD modeling in veterinary field: Dose optimization and drug resistance prediction. BioMed Research International. 1–12.

7. Aitken, A. E., Richardson, T.A. and Morgan, E.T. (2006). Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in inflammation. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 46: 123-149.

8. Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. Cell, 124: 783-801.

9. Aleman, L., and Guerrero, J. (2018). Hiperglicemia por sepsis: Del Mecanismo a la Clínica. Revista Médica de Chile. 146: 502–510.

10. AliAbadi, F., and Lees, P. (2000). Antibiotic treatment for animals: Effect on bacterial population and dosage regimen optimisation. Int. J. Antimicrob. Agents. 14: 307–313.

11. Ali, B.H., Al-Qarawi, A.A. and Hashaad, M. (2003). Comparative plasma pharmacokinetics and tolerance of florfenicol following intramuscular and intravenous administration to camels, sheep and goats. Vet. Res. Commun. 27: 475-483.

12. Aliyu, M., Zohora, F. T., Anka, A. U., Ali, K., Maleknia, S., Saffarioun, M., and Azizi, G. (2022). Interleukin-6 cytokine: An overview of the immune regulation, immune dysregulation, and therapeutic approach. Int. Immunopharmacol. 111: 109130.

13. Ambrose, P. G., Bhavnani, S. M., Rubino, C. M., Louie, A., Gumbo, T., Forrest, A., and Drusano, G. L. (2007). Pharmacokinetics-pharmacodynamics of antimicrobial therapy: it's not just for mice anymore. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 44: 79–86

14. Anadón, A., Martínez, M.A., Martínez, M., Ríos, A., Caballero, V., Ares, I. *et al.* (2008). Plasma and Tissue Depletion of Florfenicol and Florfenicol-amine in Chickens. J. Agric. Food Chem. 56: 11049-11056.

15. Andes, D. R., and Lepak, A. J. (2017). In vivo infection models in the pre-clinical pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of antimicrobial agents. Curr. Opin. Pharmacol. 36: 94–99.

16. Angelos, J.A., E.L. Dueger, L.W. George, T.K. Carrier, J.E. Mihalyi, S.B. Cosgrove *et al.* (2000). Efficacy of florfenicol for treatment of naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 216: 62-64.

17. Atef, M., El-Gendi, A. Y., Amer, A. A. M. and El-Aty, A. (2001). Disposition kinetics of florfenicol in goats by using two analytical methods. Transbound. Emerg. Dis. 48: 129-136.

18. Asín-Prieto, E., Rodríguez-Gascón, A., and Isla, A. (2015). Applications of the pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) analysis of antimicrobial agents. J. Infect. Chemother. 21: 319–329.

19. Bagga, A., Randhawa, S. S., Sharma, S. and Bansal, B. K. (2016). Acute phase response in lame crossbred dairy cattle. Vet. World, 9: 1204- 1208.

20. Baggot, J. D. (2001). The Physiological Basis of Veterinary Clinical Pharmacology. Iowa State University Press.

21. Balcomb, C. C., Angelos, J. A., Chigerwe, M., Byrne, B. A., Lane, V. M., Wetzlich, S. E., Sahin, O., Holler, L., Zhang, S., and Tell, L. A. (2018). Comparative pharmacokinetics of two florfenicol formulations following intramuscular and subcutaneous administration to sheep. Am. J. Vet. Res. 79: 107–114.

22. Balk R. A. (2014). Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): where did it come from and is it still relevant today? Virulence. 5: 20–26

23. Bennett, G.N. and Hickford, J.G.H. (2011). Ovine foot-rot: New approaches to an old disease. Vet. Microbiol. 148: 1-7.

24. Berge, A. C. B., Sischo, W. M. and Craigmill, A. L. (2006). Antimicrobial susceptibility patterns of respiratory tract pathogens from sheep and goats. J. Am. V. Med. Assoc. 229: 1279-1281.

25. Bergeron M. G. (1986). Tissue penetration of antibiotics. Clinical biochemistry, 19(2), 90–100.

26. Beovic, B., Mrhar, A., Karba, R., Zupancic, T., Grabnar, I., Belic, A., and Marolt-Gomiscek, M. (1999). Influence of fever on the pharmacokinetics of ciprofloxacin. Int. J. Antimicrob. Agents. 11: 81–85.

27. Birdane, Y. O. and Birdane, F. M. (2015). Pharmacokinetics of florfenicol following intravenous and intramuscular administration in dogs. Veterinarni Medicina, 60: 323-329.

28. Blatteis, C. M., Li, S., Li, Z., Perlik, V., and Feleder, C. (2004). Complement is required for the induction of endotoxic fever in guinea pigs and mice. Journal of Thermal Biology. 29:369–381.

29. Blatteis, C. M. (2006). Endotoxic fever: new concepts of its regulation suggest new approaches to its management. Pharmacology & Therapeutics, 111: 194-223.

30. Boackle, S. A., Holers, V. M., Lambris, J. D., Li, S., and Blatteis, C. M. (2005). Complement component c5a is integral to the febrile response of mice to lipopolysaccharide. Neuroimmunomodulation, 12(2), 67–80.

31. Bogaards, J. J. P., Bertrand, M., Jackson, P., Oudshoorn, M. J., Weaver, R. J., Van Bladeren, P. J. and Walther, B. (2000). Determining the best animal model for human cytochrome P450 activities: a comparison of mouse, rat, rabbit, dog, micropig, monkey and man. Xenobiotica, 30: 1131-1152.

32. Bretzlaff, K. N., Neff-Davis, C. A., Ott, R. S., Koritz, G. D., Gustafsson, B. K. and Davis, L. E. (1987). Florfenicol in non-lactating dairy cows: pharmacokinetics, binding to plasma proteins, and effects on phagocytosis by blood neutrophils. J. Vet. Pharmacol. Ther. 10: 233-240.

33. Burgess D. S. (1999). Pharmacodynamic principles of antimicrobial therapy in the prevention of resistance. Chest. 115: 19–23.

34. Cabana, V. G., Siegel, J. N. and Sabesin, S. M. (1989). Effects of the acute phase response on the concentration and density distribution of plasma lipids and apolipoproteins. J. Lipid Res. 30: 39-49.

35. Cameron, A., and McAllister, T.A. (2016). Antimicrobial usage and resistance in beef production. J. Anim. Sci. Biotechnol. 7: 1-22.

36. Cannon, M., Harford, S. and Davies, J. (1990). A comparative study on the inhibitory actions of chloramphenicol, thiamphenicol and some fluorinated derivatives. J. Antimicrob. Chemother. 26: 307-317.

37. Carroll, J. A., Reuter, R. R., Chase Jr, C. C., Coleman, S. W., Riley, D. G., Spiers, D. E. *et al.* (2009). Profile of the bovine acute-phase response following an intravenous bolus-dose lipopolysaccharide challenge. Innate Immunity, 15: 81-89.

38. Catry, B., Duchateau, L., Van de Ven, J., Laevens, H., Opsomer, G., Haesebrouck, F. *et al.* (2008). Efficacy of metaphylactic florfenicol therapy during natural outbreaks of bovine respiratory disease. J. Vet. Pharmacol. Therap. 31: 479-487.

39. Cavaillon, J.-M., Fitting, C., and Haeffner-Cavaillon, N. (1990). Recombinant C5A enhances interleukin 1 and tumor necrosis factor release by lipopolysaccharide-stimulated monocytes and macrophages. Eur. J. Immunol. 20: 253–257.

40. Cavaillon, J.-M. (2018). Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines. Toxicon. 149: 45–53.

41. Cazanga, V., Palma, C., Casanova, T., Rojas, D., Barrera, K., Valenzuela, C., Acevedo, A., Ascui-Gac, G., Pérez-Jeldres, T., and Pérez-Fernández, R. (2023). Modulation of the acute inflammatory response induced by the escherichia coli lipopolysaccharide through the interaction of Pentoxifylline and Florfenicol in a rabbit model. Antibiotics. 12: 639.

42. Ceciliani, F., Ceron, J. J., Eckersall, P. D., and Sauerwein, H. (2012). Acute phase proteins in ruminants. Journal of Proteomics. 75: 4207–4231.

43. Cerón, J. J., Eckersall, P. D. and Martínez-Subiela, S. (2005). Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. Vet. Clin. Pathol. 34: 85-99.

44. Chai, Z., Gatti, S., Toniatti, C., Poli, V., and Bartfai, T. (1996). Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to

lipopolysaccharide or IL-1 beta: a study on IL-6-deficient mice. J. Exp. Med. 183: 311–316.

45. Chandler, T. L., Westhoff, T. A., Sipka, A. S., Overton, T. R., and Mann, S. (2022). Lipopolysaccharide challenge following intravenous amino acid infusion in postpartum dairy cows: Ii. clinical and inflammatory responses. J. Dairy Sci. 105: 4611–4623.

46. Chvojka, J., Sýkora, R., Karvunidis, T., Raděj, J., Kroužecký, A., Novák, I., and Matějovič, M. (2010). New developments in septic acute kidney injury. Physiological research. 59: 859–869.

47. Closa, D. and Folch-Puy, E. (2004). Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response. IUBMB Life 56:185-191.

48. Codina, M., and Zeitlinger, M. (2022). Biomarkers predicting tissue pharmacokinetics of antimicrobials in sepsis: A Review. Clinical Pharmacokinetics. 61: 593–617.

49. Confer, A.W. (1993). Immunogens of Pasteurella. Vet. Microbiol. 37: 353-368.

50. Cook, A. L., St Claire, M. and Sams, R. (2004). Use of florfenicol in non-human primates. J. Med. Primatol. 33: 127-133.

51. Coskun, D., Corum, O., and Yazar, E. (2020). Effect of supportive therapy on the pharmacokinetics of intravenous marbofloxacin in endotoxemic sheep. J. Vet. Pharmacol. Ther. 43: 288–296.

52. Craig W. A. (1995). Interrelationship between pharmacokinetics and pharmacodynamics in determining dosage regimens for broad-spectrum cephalosporins. Diagn. Microbiol. Infec. Dis. 22: 89–96

53. Cray, C., Zaias, J. and Altman, N. H. (2009). Acute phase response in animals: a review. Comparative medicine, 59: 517-526.

54. Cray, C. (2012). Acute phase proteins in animals. Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. 105: 113-150.

55. Cunningham, P. N., Dyanov, H. M., Park, P., Wang, J., Newell, K. A., and Quigg, R. J. (2002). Acute renal failure in endotoxemia is caused by TNF acting directly on TNF receptor-1 in kidney. The Journal of Immunology. 168: 5817–5823.

56. Cunningham, A. A., Daszak, P. and Wood, J. (2017). One Health, emerging infectious diseases and wildlife: two decades of progress? Phil. Trans. R. Soc. B 372: 1-8.

57. Dalvi, R.R., Nunn, V.A. and Juskevich, J. (1987). Hepatic cytochrome P-450 dependent drug metabolizing activity in rats, rabbits and several food-producing species. J. Vet. Pharmacol. Therap. 10: 164-168.

58. DeBlois, D., and Horlick, R. A. (2001). Endotoxin sensitization to kinin B1receptor agonist in a non-human primate model: Haemodynamic and pro-inflammatory effects. Br. J. Pharmacol. 132: 327–335.

59. De Boever, S., Neirinckx, E. A., Meyer, E., De Baere, S., Beyaert, R., De Backer, P. and Croubels, S. (2010). Pharmacodynamics of tepoxalin, sodium-salicylate and ketoprofen in an intravenous lipopolysaccharide inflammation model in broiler chickens. J. Vet. Pharmacol. Therap. 33: 564-572.

60. De Craene, B.A., Deprez, P., D'Haese E., Nelis, H.J., Van den Bossche, W. and De Leenheer, A.P. (1997). Pharmacokinetics of Florfenicol in Cerebrospinal Fluid and Plasma of Calves. Antimicrob. Agents. Chemother. 41: 1991-1995.

61. De Vriese A. S. (2003). Prevention and treatment of acute renal failure in sepsis. Journal of the American Society of Nephrology: JASN. 14: 792–805.

62. Dinarello, C. A., Gatti, S., Bartfai, T. (1999). Fever: links with an ancient receptor. Curr. Biol. 9: R147-R150.

63. Dorey, L., Pelligand, L., Cheng, Z., and Lees, P. (2017). Pharmacokinetic/pharmacodynamic integration and modelling of Florfenicol for the pig pneumonia pathogens *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida.* PLOS ONE, 12: e0177568.

64. Dutta, P., Ryan, D.E., Tabrizchi, R. (2001). The influence of phosphodiesterase inhibitor, Rolipram, on hemodynamics in lipopolysaccharide-treated rats. Jpn. J. Pharmacol. 85: 241-249.

65. Ebersole, J. L. and Cappelli, D. (2000). Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. Periodontology 23: 19-49.

66. Eckersall, P.D. (2004). The time is right for acute phase protein assays. Vet. J. 168: 3-5.

67. Eckersall, P.D., Bell, R. (2010). Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. The Veterinary Journal. 185: 23-27.

68. El-Aty, A.M., Goudah, A., El-Sooud, K.A., El-Zorba, H.Y., Shimoda, M. and Zhou, H.-H., (2004). Pharmacokinetics and bioavailability of florfenicol following intravenous, intramuscular and oral administration in rabbits. Vet. Res. Commun. 28: 515-524.

69. El-Banna, H. A. (1998). Pharmacokinetics of florfenicol in normal and Pasteurella-infected Muscovy ducks. Br. Poult. Sci. 39: 492-496.

70. El-Kadi, A. O., Bleau, A. M., Dumont, I., Maurice, H. and du Souich, P. (2000). Role of reactive oxygen intermediates in the decrease of hepatic cytochrome P450 activity by serum of humans and rabbits with an acute inflammatory reaction. Drug Metab. Dispos. 28: 1112-1120.

71. Elmas, M. and Uney, K. (2006). Influence of Escherichia coli Endotoxin-Induced Endotoxaemia on the Pharmacokinetics of Enrofloxacin after Intravenous Administration in Rabbits. Transbound. Emerg. Dis. 53: 410-414.

72. Elmas, M., Yazar, E., Uney, K., Er, A. and Traş, B. (2008). Pharmacokinetics of enrofloxacin and flunixin meglumine and interactions between both drugs after intravenous co-administration in healthy and endotoxaemic rabbits. Vet. J. 177: 418-424.

73. EMA (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, UK). 1999. Florfenicol (extension to pigs). Summary report. EMEA/MRL/591/99-Final. EMEA, London, UK.

74. EMA (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, UK). 2002. Florfenicol (extension to all food producing species). Summary report. EMEA/MRL/822/02-Final. EMEA, London, UK.

75. Eng, J. (2003). Sample size estimation: how many individuals should be studied? Radiology, 227: 309-313.

76. Evans, S.S., Repasky, E. A., Fisher, D.T. (2015). Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. Nat. Rev. Immunol. 15:335-349.

77. Fedeniuk, R. W., Mizuno, M., Neiser, C. and O'Byrne, C. (2015). Development of LC–MS/MS methodology for the detection/determination and confirmation of chloramphenicol, chloramphenicol 3-O-β-d-glucuronide, florfenicol, florfenicol amine and thiamphenicol residues in bovine, equine and porcine liver. J. Chromatogr. B, 991: 68-78.

78. Felmer, R., Zúñiga, J., López, A. y Miranda, H. (2009). Prevalencia y distribución espacial de brucelosis, leucosis bovina, diarrea viral bovina y rinotraqueítis infecciosa bovina a partir del análisis ELISA de estanques prediales en lecherías de la IX Región, Chile. Arch. Med. Vet. 41: 17-26.

79. Feng, J. B., Huang, D. R., Zhong, M., Liu, P. and Dong, J. D. (2016). Pharmacokinetics of florfenicol and behaviour of its metabolite florfenicol amine in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) after oral administration. J. Fish Dis. 39: 833-843.

80. Fernandez-Munoz, R., Monro, R. E., Vazquez, D., and Torres-Pinedo, R. (1971). Substrate-and antibiotic-binding sites at the peptidyl-transferase centre of

escherichia coli ribosomes. studies on the chloramphenicol, lincomycin and erythromycin sites. Eur. J. Biochem. 23: 185–193.

81. Fink-Gremmels, J. (2008). Implications of hepatic cytochrome P450-related biotransformation processes in veterinary sciences. Eur. J. Pharmacol. 585: 502-509.

82. Firmino, M., Weis, S., Souza, J. M. F., Gomes, B. R. B., Mól, A. R., Mortari, M. R., Souza, G.E.P., Coca, G.C., Williams, T.C.R., Fontes, W., Ricart, C.A.O., de Souza, M.V., Veiga-Souza, F.H. (2018). Label-free quantitative proteomics of rat hypothalamus under fever induced by LPS and PGE2. J. Proteomics 187: 182-199.

83. Foster, D. M., Martin, L. G. and Papich, M. G. (2016). Comparison of active drug concentrations in the pulmonary epithelial lining fluid and interstitial fluid of calves injected with enrofloxacin, florfenicol, ceftiofur, or tulathromycin. PloS one, 11: e0149100, pág. 1-16.

84. Freire, M.O., Van Dyke, T.E. (2013). Natural resolution of inflammation. Periodontol.2000 63: 149-164.

85. Funk, S., Bogich, T., Jones, K.E., Kilpatrick, A.M. and Daszak, P. (2013). Quantifying Trends in Disease Impact to Produce a Consistent and Reproducible Definition of an Emerging Infectious Disease. PLoS ONE 8: 1-5.

86. Galanos, C., Lüderitz, O., Rietschele, E. T., Westphal, O., Brade, H., Brade, L. *et al.* (1985). Synthetic and natural Escherichia coli free lipid A express identical endotoxic activities. The FEBS Journal, 148: 1-5.

87. García-Alvarez, A., Fernández-Garayzábal, J. F., Chaves, F., Pinto, C., and Cid, D. (2018). Ovine Mannheimia haemolytica isolates from lungs with and without pneumonic lesions belong to similar genotypes. Veterinary microbiology. 219: 80–86.

88. Gaunt, P. S., Langston, C., Wrzesinski, C., Gao, D., Adams, P., Crouch, L. *et al.* (2012). Single intravenous and oral dose pharmacokinetics of florfenicol in the channel catfish (Ictalurus punctatus). J. Vet. Pharmacol. Therap. 35: 503-507.

89. Gandhi, A., Moorthy, B., Ghose, R. (2012). Drug disposition in pathophysiological conditions. Curr. Drug Metab. 13: 1327-1344.

90. Giri, S. N., Emau, P., Cullor, J. S., Stabenfeldt, G. H., Bruss, M. L., Bondurant, R. H., and Osburn, B. I. (1990). Effects of endotoxin infusion on circulating levels of eicosanoids, progesterone, cortisol, glucose and lactic acid, and abortion in pregnant cows. Veterinary microbiology. 21:211–231.

91. Gomes, A.P., Alves, D.L.S., Miguel, P.S.B., Inoue, V.H., Correia, T.C., Santana, L.A. *et al.* (2016). Anti-Inflammatory Cytokines in Sepsis: Immunological Studies and In Silico Investigation. J. Pharma. Care Health Sys. 3: 1-6.

92. Goodwin-Ray, K. A., Stevenson, M. A., Heuer, C., and Cogger, N. (2008). Economic effect of pneumonia and pleurisy in lambs in New Zealand. N. Z. Vet. J. 56: 107–114.

93. Goralski, K. B., Hartmann, G., Piquette-Miller, M. and Renton, K. W. (2003). Downregulation of mdr1a expression in the brain and liver during CNS inflammation alters the in vivo disposition of digoxin. Br. J. Pharmacol. 139: 35-48.

94. Gridley, D. S., Miller, G. M., & Pecaut, M. J. (2007). Radiation and primary response to lipopolysaccharide: bone marrow-derived cells and susceptible organs. In vivo 21: 453–461.

95. Gross, V., and Andus, T. (1992). Human recombinant C5a enhances lipopolysaccharide-induced synthesis of interleukin-6 by human monocytes. Eur. J. Clin. Invest. 22: 271–276.

96. Guerre, P., Pineau, T., Costet, P., Burgat, V. and Galtier, P. (2000). Effects of AFB1 on CYP 1A1, 1A2 and 3A6 mRNA, and P450 expression in primary culture of rabbit hepatocytes. Toxicol. Lett. 111: 243-251.

97. Gupta, A., Rhodes, G. J., Berg, D. T., Gerlitz, B., Molitoris, B. A., and Grinnell, B. W. (2007). Activated protein C ameliorates LPS-induced acute kidney injury and downregulates renal INOS and angiotensin 2. American journal of physiology. Renal physiology. 293: F245–F254.

98. Gutierrez Olvera, L., Marcos Benitez, X., García-Guzmán, P., Monroy-Barreto, M., and Sumano, H. (2022). Pharmaceutical characterization and pharmacokinetics of florfenicol-loaded alginate dried beads in rabbits. World Rabbit Science. 30: 153–162.

99. Hadfield, J. M., Bowdridge, E. C., Holásková, I., Elsasser, T. H., and Dailey, R. A. (2018). Breed-specific differences in the immune response to lipopolysaccharide in ewes. J. Anim. Sci. 96: 4220–4228.

100. Haslett, C., Worthen, G. S., Giclas, P. C., Morrison, D. C., Henson, J. E., and Henson, P. M. (1987). The pulmonary vascular sequestration of neutrophils in endotoxemia is initiated by an effect of endotoxin on the neutrophil in the rabbit. Am. Rev. Respir. dis. 136: 9–18

101. He, J., Wu, N., Luo, P., Guo, P., Qu, J., Zhang, S. *et al*. (2017). Development of a heterologous enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of clindamycin and lincomycin residues in edible animal tissues. Meat Science 125:137-142.

102. Hoar, B. R., Jelinski, M. D., Ribble, C. S., Janzen, E. D. and Johnson, J. C. (1998). A comparison of the clinical field efficacy and safety of florfenicol and tilmicosin for the treatment of undifferentiated bovine respiratory disease of cattle in western Canada. Can. Vet. J. 39: 161-166.

103. Holmes, K., Bedenice, D. and Papich, M. G. (2012). Florfenicol pharmacokinetics in healthy adult alpacas after subcutaneous and intramuscular injection. J. Vet. Pharmacol. Therap. 35: 382-388.

104. Hu, B., Huang, S., Yin, L. (2021). The cytokine storm and COVID-19. J. Med. Virol. 93: 250-256.

105. Huang, W.-T., Niu, K.-C., Chang, C.-K., Lin, M.-T., and Chang, C.-P. (2008). Curcumin inhibits the increase of glutamate, hydroxyl radicals and PGE2 in the hypothalamus and reduces fever during LPS-induced systemic inflammation in rabbits. Eur. J. Pharmacol. 593: 105–111.

106. Huh, Y., Keep, R. F. and Smith, D. E. (2013). Impact of lipopolysaccharide-induced inflammation on the disposition of the aminocephalosporin cefadroxil. Antimicrob. Agents Chemother. 57: 6171-6178.

107. Hurtado, S. e Iregui, C. (2010). El lipopolisacárido. Revista de Medicina Veterinaria. 19: 37-45.

108. Illambas, J., Potter, T., Sidhu, P., Rycroft, A. N., Cheng, Z., and Lees, P. (2013). Pharmacodynamics of florfenicol for calf pneumonia pathogens. The Veterinary record. 172: 340.

109. Imran, M., Tawab, A., Rauf, W., Rahman, M., Khan, Q. M., Asi, M. R. *et al.* (2017). LC–MS/MS based method development for the analysis of florfenicol and its application to estimate relative distribution in various tissues of broiler chicken. J. Chromatogr. B, 1063: 163-173.

110. Ioannides, C. (2006). Cytochrome P450 Expression in the Liver of Food-Producing Animals. Curr. Drug Metab. 7: 335-348.

111. Ismail, M. and El-Kattan, Y. A. (2009). Comparative pharmacokinetics of florfenicol in the chicken, pigeon and quail. Br. Poult. Sci. 50: 144-149.

112. Jacobsen, S., Toelboell, T. and Andersen, P. H. (2005). Dose dependency and individual variability in selected clinical, haematological and blood biochemical responses after systemic lipopolysaccharide challenge in cattle. Veterinary research, 36: 167-178.

113. Janeway, C.A. and Medzhitov, R. (2002). Innate Immune Recognition. Annu. Rev. Immunol. 20: 197-216.

114. Jenkins, J. R. (2008). Rabbit diagnostic testing. Journal of Exotic Pet Medicine. 17: 4–15.

115. Jerzsele, A. (2012). Comparative Veterinary Pharmacokinetics, Readings in Advanced Pharmacokinetics - Theory, Methods and Applications, Dr. Ayman Noreddin (Ed.), ISBN: 978-953-51-0533-6.

116. Jeyaseelan, S., Sreevatsan, S. and Maheswaran, S. (2002). Role of Mannheimia haemolytica leukotoxin in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis. Anim. Health Res. Rev. 3: 69-82.

117. Jha, K., Roy, B. K., and Singh, R. C. (1996). The effect of induced fever on the biokinetics of norfloxacin and its interaction with probenecid in goats. Vet. Res. Commun. 20: 473–479.

118. Jiang, H. X., Zeng, Z. L., Chen, Z. L., Liu, J. J. and Fung, K. F. (2006). Pharmacokinetics of florfenicol in pigs following intravenous, intramuscular or oral administration and the effects of feed intake on oral dosing. J. Vet. Pharmacol. Ther. 29: 153-156.

119. Jianzhong, S., Xiubo, L., Haiyang, J. and Walter, H. H. (2004). Bioavailability and pharmacokinetics of florfenicol in healthy sheep. J. Vet. Pharmacol. therap. 27: 163-168.

120. Jin, L., Li, J., Nation, R. L., and Nicolazzo, J. A. (2011). Impact of p-glycoprotein inhibition and lipopolysaccharide administration on blood-brain barrier transport of colistin in mice. Antimicrob. agents chemother. 55: 502–507.

121. Jones, K. L., Brauman, J. N., Groome, N. P., de Kretser, D. M., and Phillips, D. J. (2000). Activin A release into the circulation is an early event in systemic inflammation and precedes the release of follistatin. Endocrinology. 141: 1905–1908.

122. Jorda, A., Wulkersdorfer, B., Schoergenhofer, C., Matzneller, P., al Jalali, V., Bauer, M., Wölfl-Duchek, M., Lackner, E., Dorn, C., Jilma, B., and Zeitlinger, M. (2022). Effect of the human endotoxin challenge on tedizolid tissue penetration. Br. J. Clin. Pharm. 89: 416–420.

123. Kabaroff, L. C., Rodriguez, A., Quinton, M., Boermans, H., and Karrow, N. A. (2006). Assessment of the ovine acute phase response and hepatic gene expression in response to escherichia coli endotoxin. Vet. Immunol. Immunopathol. 113: 113–124.

124. Khalil, S., Hamed, E. and Hassanin, O. (2012). Residue withdrawal of florfenicol from the serum and edible tissues of broiler chickens. J. Am. Sci. 8: 514-524.

125. Kiers, D., Koch, R. M., Hamers, L., Gerretsen, J., Thijs, E. J., van Ede, L., Riksen, N. P., Kox, M., and Pickkers, P. (2017). Characterization of a model of systemic inflammation in humans in vivo elicited by continuous infusion of endotoxin. Scientific Reports, 7:40149.

126. Koc, F., Ozturk, M., Kadioglu, Y., Dogan, E., Yanmaz, L.E. and Okumus, Z. (2009). Pharmacokinetics of florfenicol after intravenous and intramuscular administration in New Zealand White rabbits. Res. Vet. Sci. 87: 102-105.

127. Koc, F., Atila, A., Karakus, E., and Üney, K. (2015). Influences of flunixin and tenoxicam on the pharmacokinetics of Florfenicol in lipopolysaccharide-induced endotoxemia. Turkish J. Vet. Anim. Sci. 39:168–173.

128. Koj, A. (1996). Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. Biochim. Biophys. Acta, 1317: 84-94.

129. Koj, A. (1998). Termination of Acute-Phase Response: Role of Some Cytokines and Anti-Inflammatory Drugs. Gen. Pharmac. 31: 9-18.

130. Kowalski, P., Konieczna, L., Chmielewska, A., Olędzka, I., Plenis, A., Bieniecki, M. *et al.* (2005). Comparative evaluation between capillary electrophoresis and high-

performance liquid chromatography for the analysis of florfenicol in plasma. J. Pharm. Biomed. Anal. 39: 983-989.

131. Kumar, R. and Malik, J.K. (2003). Influence of endotoxin on the disposition kinetics and dosage regimens of oxytetracycline in calves. J. Vet. Pharmacol. Therap. 26:159-164.

132. Kume, B.B. and Garg, R.C. (1986). Pharmacokinetics and bioavailability of chloramphenicol in normal and febrile goats. J. Vet. Pharmacol. Therap. 9: 254-263.

133. Ladefoged, O. (1977). Pharmacokinetics of trimethoprim (TMP) in normal and febrile rabbits. Acta Pharmacol. Et toxicol. 41: 507-514.

134. Lake, B.G. and Price, R.J. (2013). Evaluation of the metabolism and hepatotoxicity of xenobiotics utilizing precision-cut slices. Xenobiotica. 43: 41-53.

135. Lane, V.M., Wetzlich, S., Clifford, A., Taylor, I. and Craigmill, A.L. (2004). Intravenous and subcutaneous pharmacokinetics of florfenicol in sheep. J. Vet. Pharmacol. Therap. 27: 191-196.

136. Lane, V.M., Villaroel, A., Wetzlich, S.E., Clifford, A., Taylor, I. and Craigmill, A.L. (2007). Tissue residues of florfenicol in sheep. J. Vet. Pharmacol. Therap. 31: 178-180.

137. Lashev, L. and Haritova, A. (2006). Comparative allometric analysis of pharmacokinetics of florfenicol and thiamphenicol. BJVM. 9: 115-122.

138. Leary, S., Underwood, W., Anthony, R., Cartner, S., Corey, D., Grandin, T., *et al.* (2013). AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2013 edition.

139. Lee, J. H., Cho, Y. K., Jung, Y. S., Kim, Y. C., and Lee, M. G. (2008). Effects of *escherichia coli* Lipopolysaccharide on telithromycin pharmacokinetics in rats: Inhibition of metabolism via CYP3A. Antimicrob. Agents Chemother. 52: 1046–1051.

140. Lees, P., and Toutain, P.-L. (2012). The role of pharmacokinetics in veterinary drug residues. Drug Testing and Analysis. 4: 34–39.

141. Lees, P., Pelligand, L., Ferran, A., Bousquet-Mélou, A., and Toutain, P. L. (2015). Application of pharmacological principles to dosage design of antimicrobial drugs. Pharmacology matters. 8: 22.

142. Li, J., Ding, S., Zhang, S., Li, C., Li, X., Liu, Z. *et al.* (2006). Residue Depletion of Florfenicol and Its Metabolite Florfenicol Amine in Swine Tissues after Intramuscular Administration. J. Agric. Food Chem. 54: 9614-9619.

143. Lin, J.H., (1995). Species similarities and differences in pharmacokinetics. Drug Metab. Dispos. 23, 1008-1021.

144. Lin, J.-H., and Lin, M.-T. (1996). Nitric oxide synthase-cyclo-oxygenase pathways in organum vasculosum laminae terminalis: Possible role in pyrogenic fever in rabbits. Br. J. Pharmacol. 118: 179–185.

145. Liptrott, N. J., Penny, M., Bray, P. G., Sathish, J., Khoo, S. H., Back, D. J. and Owen, A. (2009). The impact of cytokines on the expression of drug transporters, cytochrome P450 enzymes and chemokine receptors in human PBMC. Br. J. Pharmacol. 156: 497-508.

146. Liu, N., Guo, M., Mo, F., Sun, Y.-H., Yuan, Z., Cao, L.-H., and Jiang, S.-X. (2011). Involvement of P-glycoprotein and cytochrome P450 3A in the metabolism of Florfenicol of Rabbits. J. Vet. Pharmacol. Ther. 35: 202–205.

147. Lis, M., Szczypka, M., Suszko, A., Świtała, M. and Obmińska-Mrukowicz, B. (2011). The effects of florfenicol on lymphocyte subsets and humoral immune response in mice. Pol. J. Vet. Sci. 14: 191-198.

148. Liu, J., Fung, K. F., Chen, Z., Zeng, Z. and Zhang, J. (2003). Pharmacokinetics of florfenicol in healthy pigs and in pigs experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae.* Antimicrob. Agents Chemother. 47: 820-823.

149. Liu, L., Guo, M., Mo, F., Sun, Y.-H., Yuan, Z., Cao, L.-H. *et al.* (2011). Involvement of P-glycoprotein and cytochrome P450 3A in the metabolism of florfenicol of rabbits. J. Vet. Pharmacol. Therap. 35: 202-205.

150. Lobell, R. D., Varma, K. J., Johnson, J. C., Sams, R. A., Gerken, D. F. and Ashcraft, S. M. (1994). Pharmacokinetics of florfenicol following intravenous and intramuscular doses to cattle. J. Vet. Pharmacol. Therap. 17: 253-258.

151. Lu, Y. C., Yeh, W. C. and Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. Cytokine, 42: 145-151.

152. Maaland, M. G., Mo, S. S., Schwarz, S. and Guardabassi, L. (2015). In vitro assessment of chloramphenicol and florfenicol as second-line antimicrobial agents in dogs. J. Vet. Pharmacol. Therap. 38: 443-450.

153. Marca, M. C., Gómez-Quintero, A., Viñuales, C., and Rodríguez-Yoldi, M. J. (2009). Changes in plasma hormone levels following lipopolysaccharide injection in rabbits. The Veterinary Journal. 180: 213–220.

154. Marciniec, B., Stawny, M., Kachlicki, P., Jaroszkiewicz, E. and Needham, M. (2009). Radiostability of florfenicol in the solid state. Analytical sciences, 25: 1255-1260.

155. Martinez, M. N., Toutain, P., and Turnidge, J. (2013). The pharmacodynamics of antimicrobial agents. Antimicrob. Ther. Vet. Med. 79–103.

156. Martinez, M. N., Greene, J., Kenna, L., Kissell, L., and Kuhn, M. (2020). The Impact of Infection and Inflammation on Drug Metabolism, Active Transport, and Systemic Drug Concentrations in Veterinary Species. Drug Metab. Dispos. 48: 631–644.

157. Maté, M. L., Ballent, M., Larsen, K., Lifschitz, A., Lanusse, C. and Virkel, G. (2015). Gene expression and enzyme function of two cytochrome P450 3A isoenzymes in rat and cattle precision cut liver slices. Xenobiotica, 45: 563-570.

158. McCarthy, G. M., Bridges, C. R., Blednov, Y. A., and Harris, R. A. (2017). CNS cell-type localization and LPS response of TLR signaling pathways. F1000Research. 6: 1144.

159. McKellar, Q. A. and Varma, K. J. (1996). Pharmacokinetics and tolerance of florfenicol in Equidae. Equine Vet. J. 28: 209-213.

160. McKellar, Q. A., Sanchez Bruni, S. F., and Jones, D. G. (2004). Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of antimicrobial drugs used in veterinary medicine. J. Vet. Pharmacol. Ther. 27: 503–514.

161. Melillo A. (2007). Rabbit Clinical Pathology. Journal of exotic pet medicine. 16: 135–145.

162. Monshouwer, M., Witkamp, R. F., Nijmeijer, S. M., Leengoed, L., Vernooy, H. C. M., Verheijden, J. H. M. and Miert, A. V. (1996). A lipopolysaccharide-induced acute phase response in the pig is associated with a decrease in hepatic cytochrome P450-mediated drug metabolism. J. Vet. Pharmacol. Therap., 19: 382-388.

163. Morgan, E.T. (1997). Regulation of Cytochromes P450 during inflammation and infection. Drug Metab. Rev. 29: 1129-1188.

164. Morgan, E.T., Goralski, K.B., Piquette-Miller, M., Renton, K.W., Robertson, G.R., Chaluvadi, M.R. *et al.* (2008). Regulation of drug –metabolizing enzymes and transporters in infection, inflammation and cancer. Drug Metab. Dispos. 36: 205-216.

165. Morgan, E.T. (2009). Impact of infectious and inflammatory disease on cytochrome P450-mediated drug metabolism and pharmacokinetics. Clin. Pharmacol. Ther. 85:434-438.

166. Moses, V.S. and Bertone, A.L. (2002). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Vet. Clin. Equine 18: 21-37.

167. Mota, C. M. D., and Madden, C. J. (2022). Neural circuits mediating circulating interleukin-1β-evoked fever in the absence of prostaglandin E2 production. Brain, Behavior, and Immunity. 103: 109–121.

168. Murata, H., Shimada, N. and Yoshioka, M. (2004). Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. Vet. J. 168: 28-40.

169. Naylor, D., Sharma, A., Li, Z., Monteith, G., Sullivan, T., Canovas, A., Mallard, B. A., Baes, C., and Karrow, N. A. (2020). Short communication: Characterizing ovine serum stress biomarkers during endotoxemia. Journal of Dairy Science. 103: 5501–5508.

170. Nebbia, C., Dacasto, M., Giaccherino, A. R., Albo, A. G. and Carletti, M. (2003). Comparative expression of liver cytochrome P450-dependent monooxygenases in the horse and in other agricultural and laboratory species. Vet. J. 165: 53-64.

171. Netea, M. G., Kullberg, B. J. and Van der Meer, J. W. (2000). Circulating cytokines as mediators of fever. Clin. Infect. Dis. 31(Supplement_5), S178-S184.

172. Neu, H. C. and Fu, K. P. (1980). In vitro activity of chloramphenicol and thiamphenicol analogs. Antimicrob. Agents Chemother. 18: 311-316.

173. Nicholson, T. E. and Renton, K. W. (2001). Role of cytokines in the lipopolysaccharide-evoked depression of cytochrome P450 in the brain and liver. Biochem. Pharmacol. 62: 1709–1717.

174. Nielsen, E. I., and Friberg, L. E. (2013). Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of antibacterial drugs. Pharmacol. Rev. 65: 1053–1090.

175. Nordmo, R., Holth, J.M., Varma, K.J., Sutherland I.H. and Brokken, E.S. (1998). Evaluation of florfenicol in atlantic salmon, Salmo salar L.: efficacy against furunculosis due to Aeromonas salmonicida and cold water vibriosis due to Vibrio salmonicida. J. Fish Dis. 21: 289-297.

176. Odugbo, M.O., Odama, L.E., Umoh, J.U. and Lamorde, A.G. (2006). Pasteurella multocida pneumonic infection in sheep: Prevalence, clinical and pathological studies. Small Rumin. Res. 66: 273-277.

177. Palma, C., Ramírez, J., Benavente, A., Cazanga, V., Venegas, M. and Pérez, R. (2011). Pharmacokinetics of florfenicol and florfenicol-amine after intravenous administration in sheep. J. Vet. Pharmacol. Therap. 35: 508-511.

178. Palócz, O., Gál, J., Clayton, P., Dinya, Z., Somogyi, Z., Juhász, C., and Csikó, G. (2014). Alternative treatment of serious and mild Pasteurella multocida infection in New Zealand White rabbits. BMC veterinary research. 10: 276

179. Paltrinieri, S. (2008). The feline acute phase reaction. Vet. J. 177:26-35.

180. Park, B. K., Lim, J. H., Kim, M. S. and Yun, H. I. (2006). Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite, florfenicol amine, in the Korean catfish (Silurus asotus). J. Vet. Pharmacol. Therap. 29: 37-40.

181. Park, B.-K., Lim, J.-H., Kim, M.-S., Hwang, Y.-H. and Yun, H.-I. (2007). Pharmacokinetics of florfenicol and its major metabolite, florfenicol amine, in rabbits. J. Vet. Pharmacol. Therap. 30: 32-36.

182. Park, B. K., Lim, J. H., Kim, M. S., Hwang, Y. H. and Yun, H. I. (2008). Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite, florfenicol amine, in dogs. Res. Vet. Sci. 84: 85-89.

183. Peatman, E., Baoprasertkul, P., Terhune, J., Xu, P., Nandi, S., Kucuktas, H. *et al.* (2007). Expression analysis of the acute phase response in channel catfish (Ictalurus punctatus) after infection with a Gram-negative bacterium. Dev. Comp. Immunol. 31: 1183-1196.

184. Pestel, S., Jungermann, K., Götze, O., and Schieferdecker, H. L. (2002). Inhibition by prostaglandin E2 of anaphylatoxin C5A- but not zymosan-induced prostanoid release from rat Kupffer cells. Laboratory Investigation. 82: 463–471.

185. Pijpers, A., Schoevers, E. J., van Gogh, H., van Leengoed, L. A., Visser, I. J., van Miert, A. S., and Verheijden, J. H. (1990). The pharmacokinetics of oxytetracycline following intravenous administration in healthy and diseased pigs. J. Vet. Pharmacol. Therap. 13: 320–326.

186. Plessers, E., Wyns, H., Watteyn, A., Pardon, B., De Backer, P., Croubels, S. (2015). Characterization of an intravenous lipopolysaccharide inflammation model in calves with respect to the acute-phase response. Vet. Immunol. Immunopathol 163: 46–56.

187. Plessers, E., Wyns, H., Watteyn, A., Pardon, B., Baere, S. D., Sys, S. U., Backer, P. D., and Croubels, S. (2016). Immunomodulatory properties of gamithromycin and ketoprofen in lipopolysaccharide-challenged calves with emphasis on the acute-phase response. Vet. Immunol. Immunopathol. 171:28–37.

188. Poli-de-Figueiredo, L. F., Garrido, A. G., Nakagawa, N., & Sannomiya, P. (2008). Experimental models of sepsis and their clinical relevance. Shock. 30: 53–59.

189. Poloyac, S., Tosheva, R., Gardner, B., Shedlofsky, S., and Blouin, R. (1999). The effect of endotoxin administration on the pharmacokinetics of chlorzoxazone in humans. Clin. Pharmacol. Ther. 66: 554–562.

190. Post, L. O., Farrell, D. E., Cope, C. V., Baker, J. D., and Myers, M. J. (2003). The effect of endotoxin and dexamethasone on enrofloxacin pharmacokinetic parameters in swine. J. Pharmacol. Exp. Ther. 304: 889-895.

191. Prajapati, B.M., Gupta, J.P., Pandey, D.P., Parmar, G.A. and Chaudhari, J.D. (2017). Molecular markers for resistance against infectious diseases of economic importance. Vet. World. 10: 112-120.

192. Prajitha, N., Athira, S., and Mohanan, P. (2018). Pyrogens, a polypeptide produces fever by metabolic changes in hypothalamus: Mechanisms and detections. Immunology Letters. 204:38–46.

193. Rao, G.S., Ramesh, S., Ahmad, A.H., Tripathi, H.C., Sharma, L.D. and Malik, J.K. (2000). Effects of endotoxin-induced fever and probenecid on disposition of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravascular administration of enrofloxacin in goats. J. Vet. Pharmacol. Therap. 23: 365-372.

194. Raetz, C.R.H. and Withfield, C. (2002). Lipopolysaccharide Endotoxins. Annu. Rev. Biochem. 71: 635-700.

195. Renton, K.W. (2001). Alteration of drug biotransformation and elimination during infection and inflammation. Pharmacology & Therapeutics 92: 147-163.

196. Renton, K.W. (2004). Cytochrome P450 Regulation and Drug Biotransformation During Inflammation and Infection. Curr. Drug Metab. 5: 235-243.

197. Renton, K.W. (2005). Regulation of drug metabolism and disposition during inflammation and infection. Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 1: 629-640.

198. Richardson, T.A. and Morgan, E.T. (2005). Hepatic cytochrome P450 gene regulation during endotoxin-induced inflammation in nuclear receptor knockout mice. J. Pharmacol. Exp. Ther. 314: 703-709.

199. Riddick, D.S., Lee, C., Bhathena, A., Timsit, Y.E., Cheng, P.-Y., Morgan, E.T. *et al.* (2004). Transcriptional suppression of cytochrome P450 genes by endogenous and exogenous chemicals. Drug Metab. Dispos. 32: 367-375.

200. Riquelme, J. B., Cazanga, V. M., Palma, C. J., Castillo, L. K., and Pérez, R. (2018). Clinical and hematological changes in sheep induced by *escherichia coli* lipopolysaccharide. Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia Da UNIPAR, 21.

201. Ríos, A. (2004). Biodisponibilidad y metabolismo de un derivado fluorado del Tianfenicol en pollos Broiler. Memoria presentada para optar el grado de Doctor.

Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria, departamento de Toxicología y Farmacología. Madrid, España.

202. Riviere, J. E. (1999). Comparative pharmacokinetics: Principles, techniques, and applications. John Wiley and Sons.1°Ed.

203. Róka, B., Tod, P., Kaucsár, T., Vizovišek, M., Vidmar, R., Turk, B., Fonović, M., Szénási, G., and Hamar, P. (2019). The acute phase response is a prominent renal proteome change in sepsis in mice. Int. J. Mol. Sci. 21: 200.

204. Romanovsky, A. A., and Blatteis, C. M. (1995). Biphasic fever: What triggers the second temperature rise? Am. J. Physiol-Regul, Integr. Comp. Physiol 269.

205. Romanovsky, A. A., Simons, C. T., and Kulchitsky, V. A. (1998). “biphasic” fevers often consist of more than two phases. Am. J. Physiol-Regul, Integr. Comp. Physiol. 275. R323-R331.

206. Romanovsky, A. A., Almeida, M. C., Aronoff, D. M., Ivanov, A. I., Konsman, J. P., Steiner, A. A., and Turek, V. F. (2005). Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. Frontiers in bioscience 10: 2193–2216.

207. Rosadini C.V. and Kagan, J.C. (2017). Early innate immune responses to bacterial LPS. Curr. Opin. Immunol. 44: 14-19.

208. Rossaint, J., Margraf, A., and Zarbock, A. (2018). Role of platelets in leukocyte recruitment and resolution of inflammation. Frontiers in Immunology, 9.

209. Roth, J. (2006). Endogenous antipyretics. Clinica Chimica Acta. 371: 13–24.

210. Roth, J. and Blatteis, C. M. (2014). Mechanisms of fever production and lysis: lessons from experimental LPS fever. Compr. Physiol. 4: 1563-1604.

211. Saco, Y. and Bassols, A. (2023). Acute phase proteins in cattle and swine: A review. Vet. Clin. Pathol. 52: 50-63.

212. SAG (Servicio Agrícola y Ganadero, Chile). (2014). División de Protección Pecuaria. Subdepartamento de Sanidad Animal. Unidad de Vigilancia y Control de Enfermedades. Informe Sanidad Animal Chile, Año 2014, Pág. 1-94.

213. SAG (Servicio Agrícola y Ganadero, Chile). (2018). División de Protección Pecuaria. Subdepartamento de Sanidad Animal. Unidad de Vigilancia y Control de Enfermedades. Informe Sanidad Animal Chile, Año 2018, Pág. 1-123.

214. SAG (Servicio Agrícola y Ganadero, Chile). (2021). División de Protección Pecuaria. Subdepartamento de Sanidad Animal. Unidad de Vigilancia y Control de Enfermedades. Informe Sanidad Animal Chile, Año 2021, Pág. 1-87.

215. Saitoh, T., Kokue, E. and Shimoda, M. (1999). The suppressive effects of lipopolysaccharide-induced acute phase response on hepatic cytochrome P450-dependent drug metabolism in rabbits. J. Vet. Pharmacol. Therap. 22: 87-95.

216. Saitoh, T., Kokue, E., and Shimoda, M. (2000). The impact of acute phase response on the plasma clearance of antipyrine, theophylline, phenytoin and nifedipine in rabbits. J. Vet. Pharmacol. Ther. 23: 153–158.

217. Sakata, Y., Morimoto, A., Long, N. C. and Murakami, N. (1991). Fever and acute-phase response induced in rabbits by intravenous and intracerebroventricular injection of interleukin-6. Cytokine, 3: 199-203.

218. Salvesen, O., Reiten, M.R., Heegaard, P., Tranulis, M., Espenes, A., Skovgaard, K. *et al.* (2016). Activation of innate immune genes in caprine blood leukocytes after systemic endotoxin challenge. BMC Vet. Res. 12: 1-10.

219. Samuelsen, O. B. and Bergh, Ø. (2004). Efficacy of orally administered florfenicol and oxolinic acid for the treatment of vibriosis in cod (Gadus morhua). Aquaculture, 235: 27-35.

220. Sams, R. (1994): Florfenicol: chemistry and metabolism of a novel broadspectrum antibiotic. In: Proceedings of the XVIII World Buiatrics Congress, Bologna, Italy, 13–17.

221. Sande, M.A., Mandell, G.L. (1980). Antimicrobial Agents, En: Goodman Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics. 1181-1199. Mac Millan.Saper, C.B. and Breder, C.D. (1994). The neurologic basis of fever. N. Eng. J. Med. 330: 1880-1886.

222. Saper, C. B., Romanovsky, A. A., and Scammell, T. E. (2013). Neural circuitry engaged by prostaglandins during the sickness syndrome. Nature Neuroscience, 15: 1088–1095.

223. Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B. and Cloeckaert, A. (2004). Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. FEMS Microbiol. Rev. 28: 519-542.

224. Sidhu, P., Rassouli, A., Illambas, J., Potter, T., Pelligand, L., Rycroft, A., and Lees, P. (2013). Pharmacokinetic-pharmacodynamic integration and modelling of Florfenicol in calves. J. Vet. Pharmacol. Ther. 37: 231–242.

225. Silbergeld, E. K., Graham, J. and Price, L.B. (2008). Industrial Food Animal Production, Antimicrobial Resistance, and Human Health. Annu. Rev. Public Health 29: 151-169.

226. Singbartl, K., and Ley, K. (2004). Leukocyte recruitment and Acute Renal Failure. J. Mol. Med. 82: 91–101.

227. Schering-Plough Animal Health Corp. New Jersey, USA (2007). Nuflor, an antibiotic. Type A medicated article for swine, Technical Monograph, pág. 1-34.

228. Schroedl, W., Jaekel, L., and Krueger, M. (2003). C-reactive protein and antibacterial activity in blood plasma of colostrum-fed calves and the effect of lactulose. Journal of dairy science. 86: 3313–3320.

229. Schultze, J.L., Mass, E., Schlitzer, A. (2019). Emerging principles in myelopoiesis at homeostasis and during infection and inflammation. Immunity 50: 288-301.

230. Shedlofsky, S. I., Israel, B. C., McClain, C. J., Hill, D. B., and Blouin, R. A. (1994). Endotoxin administration to humans inhibits hepatic cytochrome P450-mediated drug metabolism. J. Clin. Investig. 94: 2209–2214.

231. Shin, S.J., Kang, S.G., Nabin, R., Kang, M.L. and Yoo, H.S. (2005). Evaluation of the antimicrobial activity of florfenicol against bacteria isolated from bovine and porcine respiratory disease. Vet. Microbiol. 106: 73-77.

232. Short, C.R., Flory, W., Hsieh, L.C., Aranas, T., Ou, S.-P. and Weissinger, J., (1988). Comparison of hepatic drug metabolizing enzyme activities in several agricultural species. Comp. Biochem. Physiol. 91: 419-424.

233. Soback, S., Paape, M. J., Filep, R. and Varma, K. J. (1995). Florfenicol pharmacokinetics in lactating cows after intravenous, intramuscular and intramammary administration. J. Vet. Pharmacol. Therap. 18: 413-417.

234. Starkie, R., Ostrowski, S. R., Jauffred, S., Febbraio, M., and Pedersen, B. K. (2003). Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF-alpha production in humans. FASEB J. 17: 884–886.

235. Steiner, A. A., Ivanov, A. I., Serrats, J., Hosokawa, H., Phayre, A. N., Robbins, J. R., Roberts, J. L., Kobayashi, S., Matsumura, K., Sawchenko, P. E., and Romanovsky, A. A. (2006). Cellular and molecular bases of the initiation of fever. PLoS biology. 4: 284.

236. Sugita, H., Kaneki, M., Tokunaga, E., Sugita, M., Koike, C., Yasuhara, S., Tompkins, R. G., and Martyn, J. A. (2002). Inducible nitric oxide synthase plays a role in LPS-induced hyperglycemia and insulin resistance. Am. J. Physiol. Endo. Metab. 282: E386–E394.

237. Syin, C., Gotschlich, E. C. and Liu, T. Y. (1986). Rabbit C-reactive protein. Biosynthesis and characterization of cDNA clones. J. Biol. Chem. 261: 5473-5479.

238. Szotáková, B., Baliharová, V., Lamka, J., Nozinová, E., Wsól, V., Velík, J., Machala, M., Neca, J., Soucek, P., Susová, S. and Skálová, L., (2004). Comparison of in vitro

activities of biotransformation enzymes in pig, cattle, goat and sheep. Res. Vet. Sci. 76, 43-51.

239. Tisoncik, J. R., Korth, M. J., Simmons, C. P., Farrar, J., Martin, T. R., and Katze, M. G. (2012). Into the eye of the cytokine storm. Microbiol. Mol. Biol. Rev.: MMBR. 76: 16–32.

240. Toldrá, F. and Reig, M. (2006). Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. Trends Food Sci. Technol. 17:482-489.

241. Törneke, K., Torren-Edo, J., Grave, K. and Mackay, D. K. J. (2015). The management of risk arising from the use of antimicrobial agents in veterinary medicine in EU/EEA countries–a review. J. Vet. Pharmacol. Therap. 38: 519-528.

242. Toutain, P.-L., and Oukessou, M. (1990). Pharmacocinétique: éléments de méthodologie. Rec. Méd. Vét. 166 : 195-203.

243. Toutain, P. L., del Castillo, J. R., and Bousquet-Mélou, A. (2002). The pharmacokinetic-pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics. Res. Vet. Sci. 73(2), 105–114.

244. Toutain, P. L., and Bousquet-Mélou, A. (2004). Plasma clearance. J. Vet. Pharmacol. Ther. 27: 415–425.

245. Toutain, P.-L., Ferran, A. and Bousquet-Mélou, A. (2010). Species differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. In: F. Cunningham, F., Elliot, J., Lees, P. (Eds.), Comparative and Veterinary Pharmacology, Handbook of Experimental Pharmacology, Springer –Verlag Berlin Heidelberg, 20-45.

246. Toutain, P.-L., Sidhu, P. K., Lees, P., Rassouli, A., and Pelligand, L. (2019). VetCAST method for determination of the pharmacokinetic-pharmacodynamic cut-off values of a long-acting formulation of Florfenicol to support clinical breakpoints for Florfenicol antimicrobial susceptibility testing in cattle. Front. Microbiol. 10:1310.

247. Trepanier L. A. (2013). Applying pharmacokinetics to veterinary clinical practice. The Veterinary clinics of North America. Small animal practice. 43: 1013–1026.

248. Tsai, C., Lin, M., Wang, J., Liao, J., and Huang, W. (2006). The antipyretic effects of Baicalin in lipopolysaccharide-evoked fever in rabbits. Neuropharmacology. 51:709–717.

249. Turvey, S. E. and Broide, D. H. (2010). Innate immunity. J. Allergy Clin. Immunol. 125: S24-S32.

250. Ueda, Y. and Suenaga, I. (1995). In vitro antibacterial activity of florfenicol against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J. Vet. Med. Sci. 57: 363-364.

251. Ulutas, P. A., and Ozpinar, A. (2006). Effect of *Mannheimia (pasteurella) haemolytica* infection on acute-phase proteins and some mineral levels in colostrum–breast milk-fed or colostrum–breast milk-deprived sheep. Vet. Res. Commun. 30:485–495.

252. Van Miert, A. S., Van Duin, C. T., Verheijden, J. H., and Schotman, A. J. (1982). Endotoxin-induced fever and associated haematological and blood biochemical changes in the goat: the effect of repeated administration and the influence of flurbiprofen. Res. Vet. Sci. 33: 248–255.

253. Van Miert, A.S.J.P.A.M. (1990). Influence of febrile disease on the pharmacokinetics of veterinary drugs. Ann. Rech. Vét. 21, suppl. 1, 11s-28s.

254. Van Miert, A. S. J. P. A. M. (1995). Pro-inflammatory cytokines in a ruminant model: Pathophysiological, pharmacological, and therapeutic aspects. Vet. Q. 17: 41-50.

255. Van Miert, A. S. J. P. A. M., Van Duin, C. T. M., and Wensing, T. (1997). Effects of Pentoxifylline and polymyxin B on the acute-phase-response to *Escherichia coli* endotoxin in dwarf goats. J. Vet. Pharmacol. Ther. 20: 61–68.

256. Van Miert, A. S. J. P. A. M. (2002). Present Concepts on the inflammatory modulators with special reference to cytokines. Vet. Res. Commun. 26: 111-126.

257. Varma, K.J., Adams, P.E., Powers, T.E., Powers, J.D. and Lamendola, J.F. (1986). Pharmacokinetics of florfenicol in veal calves. J. Vet. Pharmacol. Therap. 9:412-425.

258. Verma, S., Ahmad, A. H., Rahal, A., and Singh, K. P. (2009). Pharmacokinetics of florfenicol following single dose intravenous and intramuscular administration in goats. J. Appl. Anim. Res. 36: 93–96.

259. Voorspoels, J., D'Haese, E., Vervaet, C., De Riemaecker, D., Nelis, H., Remon, J. and Deprez, P. (1999). Pharmacokinetics of florfenicol after treatment of pigs with single oral or intramuscular doses or with medicated feed for three days. Vet. Rec. 145: 397-399.

260. Walter, E. J., Hanna-Jumma, S., Carraretto, M., and Forni, L. (2016). The pathophysiological basis and consequences of fever. Critical Care. 20.

261. Wang, T., Chen, X., Lu, M., Li, X. and Zhou, W. (2015). Preparation, characterisation and antibacterial activity of a florfenicol-loaded solid lipid nanoparticle suspension. IET Nanobiotechnol. 9: 355-361.

262. Wang, X., Yang, Y., Martínez, M.-A., Martínez, M., Lopez-Torres, B., Martínez-Larrañaga, M.-R., Wang, X., Anadón, A., and Ares, I. (2021). Interaction between Florfenicol and doxycycline involving cytochrome P450 3A in goats (Capra Hricus). Front. Vet. Sci. 8: 759716.

263. Watkins, J.B. and Klaassen, C.D. (1986). Xenobiotic biotransformation in livestock: comparison to other species commonly used in toxicity testing. J. Anim. Sci. 63: 933-942.

264. Waxman, S., San Andrés, M. D., González, F., De Lucas, J. J., San Andrés, M. I., and Rodríguez, C. (2003). Influence of *Escherichia coli* endotoxin-induced fever on the pharmacokinetic behavior of marbofloxacin after intravenous administration in goats. J. Vet. Pharmacol. Ther. 26: 65–69.

265. Willette, A. A., Lubach, G. R., and Coe, C. L. (2007). Environmental context differentially affects behavioral, leukocyte, cortisol, and interleukin-6 responses to low doses of endotoxin in the rhesus monkey. Brain, Behavior, and Immunity. 21: 807–815.

266. Witkamp, R. and Monshouwer, M. (2000). Signal transduction in inflammatory processes, current and future therapeutic targets: A mini review. Vet. Quart. 22: 11-16.

267. Wrzesinski, C. L., Crouch, L. S. and Endris, R. (2003). Determination of florfenicol amine in channel catfish muscle by liquid chromatography. J. AOAC Int. 86: 515-520.

268. Wrzesinski, C., Crouch, L., Gaunt, P., Holifield, D., Bertrand, N. and Endris, R. (2006). Florfenicol residue depletion in channel catfish, Ictalurus punctatus (Rafinesque). Aquaculture, 253: 309-316.

269. Wyns, H., Meyer, E., Plessers, E., Watteyn, A., van Bergen, T., Schauvliege, S., De Baere, S., Devreese, M., De Backer, P., and Croubels, S. (2015). Modulation by gamithromycin and ketoprofen of in vitro and in vivo porcine lipopolysaccharide-induced inflammation. Vet. Immunol. Immunopathol. 168: 211–222.

270. Xie, K., Jia, L., Yao, Y., Xu, D., Chen, S., Xie, X. *et al*. (2011). Simultaneous determination of thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in eggs by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. J. Chromatogr. B, 879(23), 2351-2354.

271. Xie, L. L., Wu, Z. X., Chen, X. X., Li, Q., Yuan, J., Liu, H. and Yang, Y. (2013). Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite, florfenicol amine, in rice field eel (Monopterus albus) after a single-dose intramuscular or oral administration. J. Vet. Pharmacol. Therap. 36: 229-235.

272. Yamashiro, O., Morimoto, A., Sakata, Y., Watanabe, T., and Murakami, N. (1993). Febrile and metabolic tolerance to endotoxin and human recombinant interleukin-1 beta in rabbits. Am. J. Physiol-Regul., Integr. Comp. Physiol. 264. R1180-R1185.

273. Yang, K.H. and Lee, M.G. (2008). Effects of Endotoxin Derived from Escherichia coli Lipopolysaccharide on the Pharmacokinetics of Drugs. Arch. Pharm. Res. 31: 1073-1086.

274. Yates, D. T., Löest, C. A., Ross, T. T., Hallford, D. M., Carter, B. H. and Limesand, S. W. (2011). Effects of bacterial lipopolysaccharide injection on white blood cell counts, hematological variables, and serum glucose, insulin, and cortisol concentrations in ewes fed low-or high-protein diets. J. Anim. Sci. 89: 4286-4293.

275. Yu, Q., Liu, Z., Waqar, A. B., Ning, B., Yang, X., Shiomi, M., Graham, M. J., Crooke, R. M., Liu, E., Dong, S., and Fan, J. (2014). Effects of antisense oligonucleotides against C-reactive protein on the development of atherosclerosis in WHHL Rabbits. Mediators of Inflammation. 2014: 1–8.

276. Yunis, A. A. (1988). Chloramphenicol: relation of structure to activity and toxicity. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 28: 83-100.

277. Zeng, Z., Fung, K. (1997). Effects of experimentally induced *Escherichia coli* infection on the pharmacokinetics of enrofloxacin in pigs. J. Vet. Pharmacol. Therap. 20 (Suppl.1) 21-86.

278. Zhang, S., Liu, Z., Guo, X., Cheng, L., Wang, Z. and Shen, J. (2008). Simultaneous determination and confirmation of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in chicken muscle by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. B. 875: 399-404.

279. Zhang, X., Song, K., Xiong, H., Li, H., Chu, X., Deng, X. (2009). Protective effect of florfenicol on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice. Int. Immunopharmacol. 9:1525–1529.

280. Zordoky, B.N.M., El-Kadi, A.O.S. (2009). Role of NF-κB in the regulation of cytochrome P450 enzymes. Curr. Drug Metab. 10: 164-178.

281. Zurita, L., Smith, P. y Núñez, C. (1990). *Escherichia Coli* enteroadhesiva (K99) y rotavirus en terneros con síndrome diarreico. Signología y serotipificación antigénica de cepas de *E. Coli.* Avances en Medicina Veterinaria, Vol. 5(2): 124

282. Zurita, L. (1995). Diarrea infecciosa del ternero causada por *escherichia coli* enterotoxigénica. TECNOVET 1 (1). Disponible en: http://web.uchile.cl/vignette/tecnovet/CDA/tecnovet_articulo/0,1409,SCID%253D8377%2526ISID%253D427,00.html.

XI. ANEXO.

Evaluación de los efectos del lipopolisacárido de *E. coli* sobre la expresión relativa de CYP3A6 en hígado de conejos.

En la Figura 47 se presentan resultados de análisis de expresión relativa de CYP3A6 analizados mediante qPCR en tiempo real a partir de muestras de hígado de conejos control y tratados con LPS de *E. coli* O128:B12. Estas muestras fueron obtenidas de conejos que recibieron tratamiento con 20 mg/kg de FFC vía IM y tres dosis de LPS de 2 µg/kg según diseño experimental correspondiente a análisis farmacocinéticos de efecto del LPS de *E. coli* sobre la disposición plasmática de FFC. No se observaron diferencias entre ambos grupos experimentales (p > 0,05) a partir de los análisis realizados.

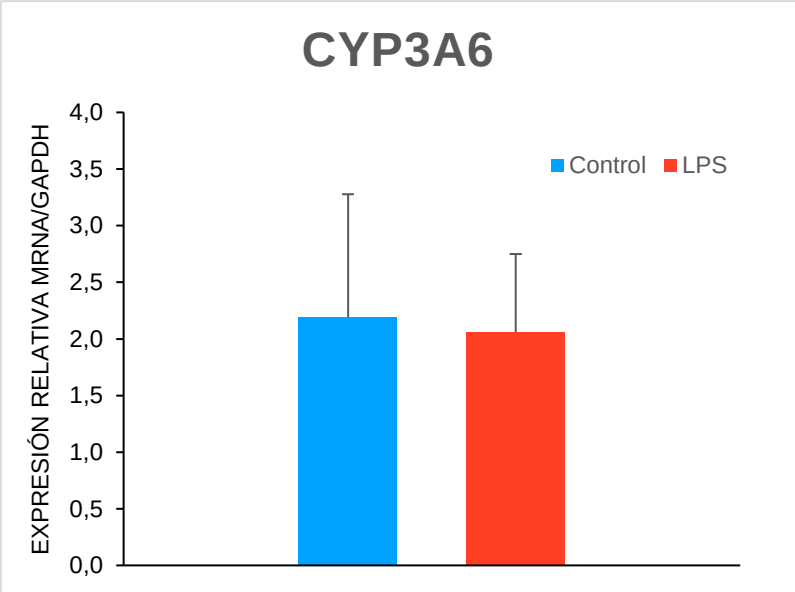

Figura 47. Expresión relativa de CYP3A6 en hígado de conejos posterior a la administración de FFC vía IM en conejos control y conejos tratados con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS) (n=5). Fuente: Elaboración propia.

AUTORIZACIÓN PUBLICACIÓN DE TESIS

Quien suscribe, (VICTORIA MATILDE CAZANGA REYES, cédula 15.933.000-1), alumna del Programa Doctorado en Ciencias Veterinarias, que imparte la Facultad de Ciencias Veterinarias, de la Universidad de Concepción, declara ser autor de la Tesis titulada: Efectos de la respuesta inflamatoria aguda inducida por el lipopolisacárido de *Escherichia coli* O128:B12 sobre la disposición plasmática y distribución tisular de florfenicol y florfenicol amina en conejos y ovinos.

SI ___X___

NO _____

concedo derecho de publicación, comunicación al público y reproducción de esa obra, en forma total o parcial en cualquier medio y bajo cualquier forma del mismo, a la Universidad de Concepción, Chile, para formar parte de la colección material o digital de cualquiera de las Bibliotecas de la Universidad de Concepción y del Repositorio Institucional UdeC. Esta autorización es de forma libre y gratuita, y considera la reproducción de la obra con fines académicos y de difusión tanto nacional como internacionalmente.

Asimismo, quien suscribe declara que dicha obra no infringe derechos de autor de terceros.

....

(FIRMA)

Fecha: 05-11-2023.