



Infectio

Print ISSN 0123-9392

Infect. vol.9 no.2 Bogotá Apr./June 2005



ARTÍCULO DE ACTUALIZACIÓN

Aportes del modelo en ratón neutropénico de infección del muslo al conocimiento sobre la farmacología de antibióticos

Andrés F. Zuluaga¹, Omar Vesga²

¹ Médico, farmacólogo. Departamento de Farmacología y Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

² Médico internista, especialista en Enfermedades Infecciosas, Departamento de Medicina Interna, Sección de Enfermedades Infecciosas, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

Correspondencia: Andrés F Zuluaga. Grupo Investigador de Problemas en Enfermedades Infecciosas, GRIPE, Calle 62 # 52-59, Laboratorio 630, Sede de Investigación Universitaria (SIU), Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Teléfono: (574) 210-6541; fax: (574) 210-6021 azuluaga@medicina.udea.edu.co

Fecha de recepción: 10/12/04 Fecha de aprobación: 15/05/05

RESUMEN

El fenómeno de la resistencia a los antibióticos obligó a que la mayoría de las autoridades mundiales hicieran un llamado de atención a la comunidad médica sobre la necesidad de controlar la prescripción desmedida, frecuentemente innecesaria, de este tipo de fármacos. El modelo en ratón de infección del muslo sirvió para demostrar que la dosificación apropiada de un agente antibiótico debe diseñarse con base en índices farmacocinéticos y farmacodinámicos que determinan su eficacia. La fracción del intervalo entre dosis (T), durante la cual los niveles séricos de los (3-lactámicos exceden la concentración inhibitoria mínima (CIM) del microorganismo, predice con exactitud su eficacia bactericida en humanos ($T > CIM$). De manera similar, el índice o razón que produce el dividir el área bajo la curva concentración por el tiempo o la concentración máxima (C_{max}) entre la CIM (área bajo la curva/CIM y C_{max}/CIM) predice la eficacia bactericida *in vivo* de quinolonas y aminoglicósidos, respectivamente. Para maximizar la eficacia y disminuir la probabilidad de la selección de mutantes resistentes, cada uno de estos índices requiere alcanzar una magnitud específica. Toda esta información, sustento científico de una verdadera revolución en la farmacología de los antibióticos, se obtuvo a partir del modelo en ratón de la infección del muslo. Este artículo revisa el impacto que ha tenido este modelo sobre el conocimiento farmacológico de los agentes antibióticos, especialmente, su aporte para la selección óptima del esquema de dosificación y la prevención de la resistencia.

Palabras clave: antibióticos, farmacología, farma-cocinética, farmacodinamia, modelos animales.

ABSTRACT

Antibiotic resistance has led clinical authorities and regulatory agencies worldwide to ask the medical community for effective measures tending to control the excessive and inappropriate prescription of these drugs. The neutropenic murine thigh infection model has been used to demonstrate that pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) indices constitute the best tool to design effective antimicrobial dosing regimens. The time that beta-lactam antibiotics exceed the minimal inhibitory concentration (MIC) of the microorganism ($T > MIC$) predicts their maximal efficacy *in vivo*, while the ratios of the area under the curve (AUC) and maximal concentration (C_{max}) to the MIC (AUC/MIC and C_{max}/MIC) do the same for fluoroquinolones and aminoglycosides, respectively. To maximize efficacy and reduce the probability of resistance during treatment, each one of these indices must reach a specific magnitude. All these information, the scientific base of a true revolution in antimicrobial pharmacology, was obtained mainly from animal experimentation with the neutropenic mouse thigh infection model. Here, we review the impact that this model has had on the pharmacological knowledge of antimicrobial agents, including its contribution to the selection of drug's dosing and prevention of resistance.

Key words: antibiotics, antimicrobials, pharmacology, pharmacokinetics, pharmacodynamics, PK/PD, animal models.

INTRODUCCIÓN

Luego del aislamiento de la penicilina (1929) y la introducción de las sulfonamidas en la práctica clínica (1936), se generaron otros agentes con mejor espectro de actividad, eficaces y relativamente seguros, que pronto llevarían a la farmacología a su "edad de oro" (1). Aunque el vertiginoso desarrollo de nuevos antibióticos llevó a creer posible la erradicación de las enfermedades infecciosas, los microorganismos demostraron que podían eludir la acción de cada nuevo agente descubierto (2).

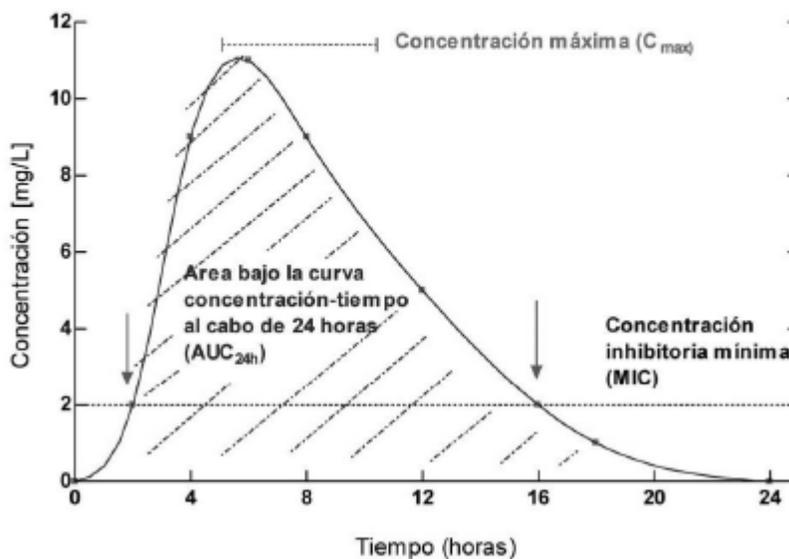
La aparición de patógenos multirresistentes, como *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Enterococcus faecium*, demostró que la capacidad terapéutica contra éstos era limitada y, en algunos casos, inexistente. La resistencia se convirtió en el principal desafío de la farmacología antibiótica e incrementó el interés científico por el desarrollo de modelos animales de experimentación con los cuales se pudiera optimizar tanto el uso de los agentes recientemente producidos como el de los ya existentes (3).

La experimentación *in vivo* brindó la oportunidad de ir más allá de la concentración inhibitoria mínima (CIM), pues condujo al descubrimiento de los parámetros farmacocinéticos, área bajo la curva concentración-tiempo, concentración máxima (C_{max}) y vida media sérica ($T_{1/2}$), y permitió cuantificar la interrelación entre las concentraciones tisulares del compuesto y sus efectos antibióticos o tóxicos (farmacodinamia) mediante parámetros como el efecto máximo (E_{max}), la dosis efectiva 50 (DE_{50} o dosis necesaria para alcanzar la mitad del E_{max}), y dosis bacteriostática (equivalente *in vivo* de la CIM), entre otros. De este modo, la evaluación de sustancias farmacológicas mediante el empleo de animales de experimentación pequeños, como ratones, ratas, curies y conejos, se estableció como requisito previo a los estudios en seres humanos (3).

Una amplia variedad de estudios efectuados en los últimos 30 años ha demostrado, mediante el modelo en ratón neutropénico de infección del muslo, que el éxito de un tratamiento antibiótico

depende tanto del nivel de exposición al fármaco -esto es, T, AUC y C_{max} - como de la potencia del compuesto contra el microorganismo infeccioso -esto es, CIM. Esta codependencia permitió definir índices farmacocinéticos y farmacodinámicos (PK/PD) que se correlacionaban de manera muy precisa con la eficacia bactericida *in vivo* (4,5), específicamente los índices PK/PD C_{max}/MIC , área bajo la curva/CIM y $T > CIM$ (figura 1).

Figura 1



Correlación de parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos. La figura describe la curva teórica obtenida mediante determinación de la concentración sérica alcanzada en voluntarios sanos tras la administración oral de un fármaco. De dicha curva farmacocinética se pueden extraer tres parámetros: (1) el punto más alto observado [representa la concentración máxima (C_{max}); (2) el área encerrada entre dicha curva y los ejes de coordenadas de la concentración sérica y del tiempo transcurrido describen el área bajo la curva (AUC); y (3) la fracción del intervalo (T) entre dosis (espacio de tiempo entre flechas). Al superponer sobre las coordenadas una variable farmacodinámica (línea negra punteada) como la concentración inhibitoria mínima (MIC), se generan tres índices farmacocinéticos / farmacodinámicos (PK / PD) que determinan la eficacia bactericida *in vivo* de los antimicrobianos: (1) la fracción de T durante la cual los niveles séricos exceden la MIC ($T > MIC$); (2) el índice que produce el dividir AUC sobre MIC (AUC/MIC); y (3) la razón obtenida tras dividir C_{max} entre MIC (C_{max}/MIC).

Una cantidad creciente de información proveniente de la experimentación *in vitro* y en modelos animales de infección sugiere que existe una asociación directa entre la magnitud de los índices farmacocinéticos y farmacodinámicos para diferentes antibióticos y su eficacia clínica y bacteriológica, aun contra microorganismos con susceptibilidad disminuida (resistentes), y dicha magnitud permanece constante entre una especie de mamífero y otra, inclusive el *Homo sapiens* (6,7). Por ejemplo, para las quinolonas está demostrado que índices como el área bajo la curva/CIM > 200 o $C_{max}/CIM > 8-12$ evitan la selección de mutantes resistentes, tanto en el hombre como en los roedores (5,8).

En este artículo se revisa el impacto que ha tenido el modelo en ratón de la infección del muslo sobre el conocimiento farmacológico de los agentes antibióticos, se sopesan sus limitaciones y se destacan sus aportes en la selección óptima del régimen de dosificación y en la prevención de la resistencia a los antibióticos.

Origen del modelo: de Selbie a Craig

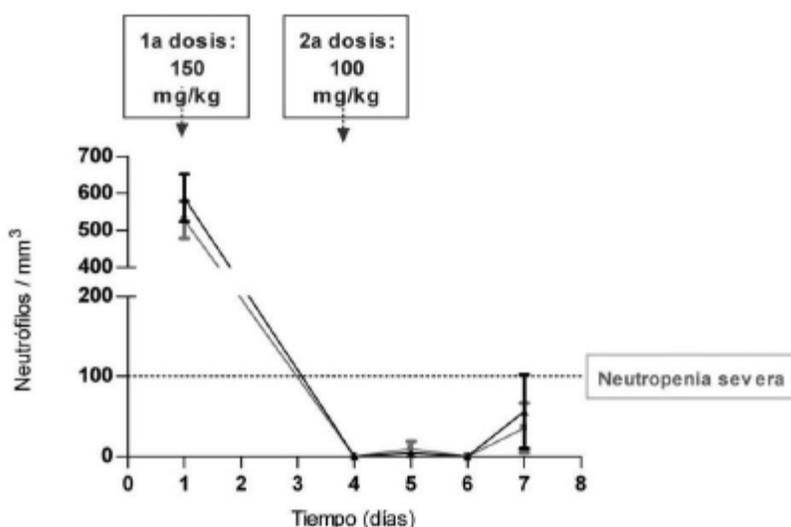
Aunque el modelo en ratón neutropénico de la infección del muslo ha adquirido importancia en la última década, su desarrollo inicial se atribuye a Selbie. Como se discute más adelante, el modelo actual conserva la mayoría de las características originales, más algunas importantes variaciones efectuadas especialmente por Craig *et al.*

Buscando cuantificar la virulencia relativa de diferentes cepas de *Staphylococcus* spp. *in vivo* (9), Selbie diseñó un modelo que consistía en la inoculación intramuscular profunda de 200 μ l de un cultivo bacteriano líquido en el muslo izquierdo de un ratón inmunocompetente, dejando el muslo derecho del animal como un control. Por medio de un calibrador se medía el edema originado en el miembro infectado y se comparaba con el sano. Luego, demostró la utilidad de su modelo en ratón para evaluar la efectividad de la penicilina sódica y procaínica en el tratamiento de infecciones por estafilococo (10). El tratamiento se inició 2 a 3 horas después de la infección, porque el iniciar más rápidamente la administración del fármaco impedía que se expresara completamente la lesión (edema) en los ratones. Aunque la eficacia (disminución del edema) de las preparaciones de penicilina evaluadas no fue estadísticamente diferente, fue posible observar que la duración del efecto curativo del antibiótico dependía del tiempo total que el medicamento permanecía en la sangre a concentraciones efectivas y de la respuesta inmune del hospedero a la infección.

Hunter *et al.* superaron la subjetividad de la medición del diámetro del muslo mediante el recuento de bacterias viables en el mismo después del tratamiento. De esta manera fue posible demostrar diferencias significativas en la actividad bactericida entre la amoxicilina y la ampicilina contra *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis*, a pesar de la similitud de ambos medicamentos en sus concentraciones séricas y en su CIM (11). Con este modelo, Dijkmans *et al.* descubrieron que el metronidazol era 8 veces más activo *in vivo* que la clindamicina para el tratamiento de *Bacteroides* spp., mientras dicha relación aparece invertida en los estudios *in vitro* (12,13). Estos hallazgos demostraron que los datos *in vitro* no reflejaban el comportamiento *in vivo*, e impulsaron el modelo animal como una herramienta indispensable dentro del estudio de compuestos farmacológicos nuevos (14).

La modificación metodológica más importante del modelo en el ratón de la infección del muslo fue implementada por Craig *et al.* Inquietos por las fallas terapéuticas observadas en los pacientes leucopenicos infectados por *P. aeruginosa* y tratados con aminoglicósidos, postularon que dicho fenómeno obedecía a la selección, durante el tratamiento, de subpoblaciones bacterianas resistentes no detectadas por las pruebas de susceptibilidad *in vitro*. Normalmente, dichas subpoblaciones son erradicadas por la respuesta bactericida del sistema inmune, pero ese no es el caso en pacientes inmunocomprometidos; sólo un modelo neutropénico permitiría acercarse al comportamiento microbiológico de este último grupo de pacientes. El modelo animal también permitiría evaluar inóculos infecciosos cercanos a los encontrados en las infecciones humanas y muy superiores a los estandarizados en las pruebas *in vitro*.

La inmunosupresión del modelo de Craig emplea dos dosis de ciclofosfamida intraperitoneal que inducen en 96 horas "neutropenia grave", pero ninguna de sus publicaciones revela la profundidad ni la duración de la misma (15). Nosotros lo determinamos recientemente en 15 ratones hembras de la cepa Udea: ICR(CD-I) con un recuento basal de 528 ± 157 células/ μ l, las cuales tratamos con ciclofosfamida (Cytoxan®, BMS), 150 y 100 mg/kg por 4 días y 1 día antes de la infección, respectivamente (16). El número de neutrófilos fue 0/ μ l en todos los ratones y se mantuvo constante durante 5 días después de la infección (figura 2). Ocho de 10 ratones seguían con 0 neutrófilos el día 7, los otros dos tenían 2 y 1 neutrófilos en todo el campo. No hubo mortalidad antes del día 5. Los ratones sobrevivientes recuperaron su recuento basal de neutrófilos para el día 11. En síntesis, la metodología de Craig mejoró significativamente el modelo en ratón de la infección del muslo, pues convirtió un modelo de infección localizada en uno de infección diseminada (sepsis) que garantiza una letalidad del 100% de los animales infectados por una amplia gama de patógenos bacterianos muy importantes en medicina humana (18,19).

Figura 2

Profundidad y duración de la neutropenia inducida en ratones posterior a la administración intraperitoneal de 250 mg/kg de ciclofosfamida. En la figura se aprecia el recuento total de neutrófilos obtenidos de 10 ratones hembra, Udea:ICR(ICD-1), de 25 ± 2 g, determinados mediante recuento manual en cámara de Newbauer (curva gris) o técnica automatizada en citómetro de flujo (curva negra). Las flechas indican las dosis (150 mg/kg y 100 mg/kg) y los días de aplicación del agente inmunosupresor (día 1 y 4, respectivamente). Neutropenia severa (verde) se obtiene (en ratones de la cepa ICR) con recuentos inferiores a 100 neutrófilos/mm³.

DESCUBRIMIENTO DE LOS ÍNDICES FARMACOCINÉTICOS Y FARMACODINÁMICOS PARA PREDECIR LA EFICACIA ANTIBIÓTICA *IN VIVO*

Después de la introducción de la penicilina en la práctica clínica, se demostró en el modelo animal que su eficacia contra *Treponema pallidum* y *Streptococcus* spp. dependía del tiempo que las concentraciones del fármaco eran detectables en el suero (14,20,21). Entonces, los esquemas de dosificación de todos los antibióticos se diseñaron para mantener los niveles séricos del fármaco por encima de la concentración inhibitoria mínima a lo largo del intervalo entre dosis (18). Según el perfil farmacocinético obtenido en voluntarios sanos o en estudios *in vitro*, la dosificación de la gran mayoría de los antibióticos se ajustaba a "500 mg cada 6 horas". Aunque dicha aproximación pudo ser efectiva para administrar algunos compuestos (como los (3-lactámicos), la formulación de los antibióticos obedeció al empirismo durante unos 50 años.

Empleando el modelo en ratón de la infección del muslo, a mediados del siglo XX, Harry Eagle demostró que la eficacia bactericida de la penicilina dependía del esquema de dosificación, pero la exquisita susceptibilidad de las bacterias Gram positivas de la época hizo que se prestase poca atención a este importante descubrimiento (17). Con base en la experiencia de Eagle, primero, y Kunin, después, Craig *et al.* resucitaron el concepto en los años ochenta, al emplear múltiples dosis e intervalos de dosificación contra una gran variedad de patógenos en el modelo en ratón neutropénico de la infección del muslo y demostrar de manera inobjetable que la eficacia *in vivo* dependía tanto de la farmacocinética como de la farmacodinamia del antibiótico (18). La CIM era el parámetro farmacodinámico más utilizado en la práctica clínica pero, diferente al supuesto universal, no predecía por sí sólo la eficacia *in vivo*.

Craig demostró cómo los parámetros fármaco-cinéticos se combinan con los parámetros

far-macodinámicos para determinar dicha eficacia. El primero es la relación de la concentración del antibiótico con la magnitud de la eficacia antibiótica. Cuando la muerte bacteriana incrementa con la dosis, el patrón de actividad es dependiente de la concentración. Al contrario, cuando los periodos de exposición prolongados incrementan la eficacia sin necesidad de modificar la dosis, el mecanismo es dependiente del tiempo. Craig también demostró que el factor determinante para que un antibiótico se comporte como dependiente de la concentración es la persistencia de su acción bacteriostática cuando ya no se detecte en el sitio de infección, una característica muy importante, conocida como efecto posantibiótico, de la cual carecen los compuestos dependientes del tiempo (22). Con base en el mecanismo que predice la eficacia, Craig clasificó los antibióticos en los tres grupos de la [tabla 1](#) (23,24).

MAGNITUD DE LOS ÍNDICES FARMACOCINÉTICOS Y FARMACODINÁMICOS PARA OPTIMIZAR LA EFICACIA MICROBICIDA Y PARA EVITAR LA SELECCIÓN DE MUTANTES RESISTENTES

***β*-lactámicos**

Los índices farmacocinéticos y farmacodinámicos se emplearon para determinar con el modelo animal el esquema de dosificación óptimo de cada antibiótico, que evitaba el surgimiento de microorganismos con susceptibilidad disminuida durante el tratamiento (18). Por ejemplo, Craig empleó un modelo en ratón de neumonía por *Klebsiella pneumoniae*, ATCC 43816, para estudiar la eficacia de 24 esquemas de dosificación diferentes de cefotaxime (25). Determinó el número de bacterias que sobreviven en el pulmón al cabo de 24 horas de tratamiento bajo cada esquema de dosificación y generó curvas sigmoideas dosis-efecto. La eficacia bactericida tuvo una baja correlación con los índices C_{max}/CIM o área bajo la curva/ CIM, pero una correlación muy alta con $T>CIM$ ($R^2 = 94\%$). *In vivo*, el efecto bacteriostático y el máximo efecto bactericida se alcanzaron con $T>CIM$ igual a 40% y 70%, respectivamente. [Figura 3](#)

Otras cefalosporinas mostraron resultados similares contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (5). Hoy se sabe que la fracción de $T>CIM$ (% $T>CIM$) requerida para alcanzar el efecto bacteriostático con carbapenems, penicilinas y cefalosporinas es de 20%, 30% y 40%, respectivamente, y que el % $T>CIM$ necesario para alcanzar la máxima eficacia bactericida es de 40%, 50% y de 60% a 70%, respectivamente (26). Estas cifras son aplicables a todos los patógenos estudiados, independientemente de su patrón de susceptibilidad o del modelo animal en el que se determinen. La única excepción es *S. aureus*, germen contra el cual estas cifras de $T>CIM$ son inferiores debido a que es susceptible al efecto posantibiótico de los (β -lactámicos (23,27).

Quinolonas

El perfil farmacocinético y farmacodinámico de las quinolonas también ha sido bien elucidado (28-33). Los estudios *in vitro* en modelos animales y clínicos han demostrado que estos agentes eliminan las bacterias más rápidamente cuando sus concentraciones están bien por encima de la CIM de los microorganismos evaluados, y ejercen un moderado a prolongado efecto posantibiótico. De estos estudios se extrae, por ejemplo, que la máxima eficacia bactericida de las quinolonas se alcanza con área bajo la curva/ CIM de 30 a 40 para *S. pneumoniae* y de 100 a 125 para bacilos Gram negativos (29-31).

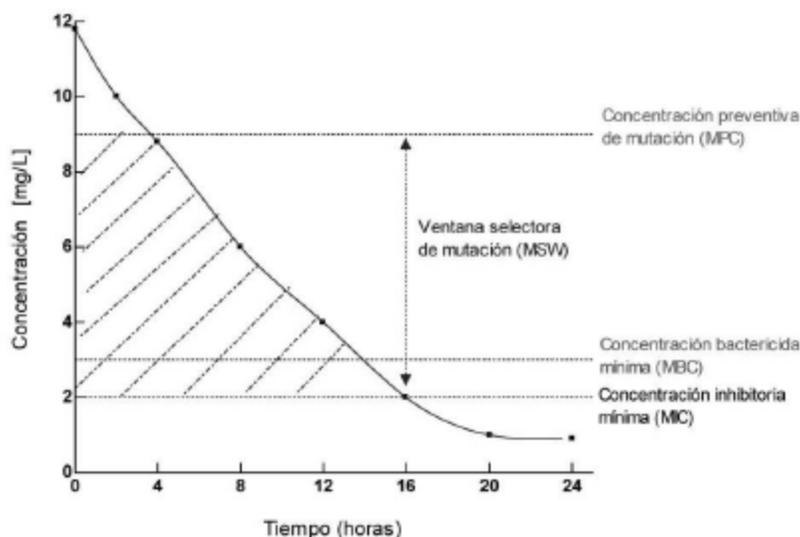
Debido a que la actividad de un antibiótico depende de la fracción libre disponible para unirse a un blanco molecular bacteriano (f , fracción no ligada a proteínas), la verdadera correlación entre los índices farmacocinéticos y farmacodinámicos es mucho más precisa cuando se estiman los índices con f en vez de la concentración total (33,34). Por ejemplo, en el modelo en ratón de infección del muslo se compararon las razones /área bajo la curva/CIM y área bajo la curva_{total}/CIM de siete diferentes quinolonas (ciprofloxacina, gatifloxacina, gemifloxacina, garenoxiloxacina, levofloxacina, moxifloxacina, ysitafloxacina) contra *S. pneumoniae* y se determinó la correlación de la magnitud de cada una con la supervivencia del 90% de los animales y la actividad bactericida. Para las siete quinolonas se demostró que existía una relación directa entre AUC/CIM de 30 a 40 y la supervivencia, pero cuando se consideraba área bajo la

curva_{total}/CIM había una variabilidad significativa en la magnitud del índice requerido para eficacia, según el grado de fijación a las proteínas. Por ejemplo, la gemifloxacina (alta fijación) requería área bajo la curva_{total}/CIM de ~ 130 , comparada con la moxifloxacina (moderada fijación) que requería área bajo la curva_{total}/CIM de ~ 45 (33). Estos hallazgos también se aplicaban para todos los otros grupos de antibióticos (19,23,34). Actualmente, sólo se concibe hablar de índices farmacocinéticos y fármaco-dinámicos considerando exclusivamente las fracciones libres de los medicamentos (26).

Aunque las razones AUC/CIM y C_{max}/CIM son los índices farmacocinéticos y farmacodinámicos que se correlacionan con la eficacia de las quinolonas en modelos de infección animal y en pacientes infectados, en la mayoría de los estudios la razón AUC/CIM , generalmente, tiene la correlación más fuerte con el pronóstico (32), mientras C_{max}/CIM parece ser el índice más apropiado cuando existe el potencial de emergencia de subpoblaciones bacterianas resistentes (33). Algunos estudios *in vitro* y en modelos animales indican que el valor mínimo de la razón C_{max}/CIM debe estar entre 8 y 12 (30,35). Como el objetivo de tratar pacientes es hacerlo óptimamente, cuando administremos una quinolona para tratar una infección por bacilos Gram negativos, la relación área bajo la curva/CIM debe alcanzar, al menos, 125 y la C_{max} debe superar la CIM, al menos, 10 veces. Con los microorganismos con CIM elevada se requiere aumentar mucho la dosis para alcanzar la relación óptima AUC/CIM y C_{max}/CIM y, bajo las dosis clínicamente utilizables, conllevan menor probabilidad de éxito durante el tratamiento y mayor probabilidad de selección de mutantes resistentes (36).

Recientemente, Drlica *et al.* aclararon mejor el concepto (37,38). Mediante estudios *in vitro*, definieron la concentración preventiva de mutantes como la concentración de antibiótico necesaria para impedir el crecimiento en agar de cualquier muíante resistente a partir de un inóculo muy grande ($10 \log_{10}$ CFU/ml). La concentración preventiva de mutantes es superior a la concentración bactericida mínima (CBM) y muy superior a la CIM, y la zona ubicada entre la CIM y la concentración preventiva de mutantes contiene la ventana selectora de mutantes (figura 4).

Figura 4



Concentración preventiva de mutantes. En la gráfica se representa un hipotético perfil farmacocinético obtenido tras la administración intravenosa de un antimicrobiano y en la cual arbitrariamente se ubican las concentraciones inhibitoria (MIC), bactericida (MBC) y preventiva de mutantes (MPC). La doble fecha indica la ventana selectora de mutación (MSW). Como se aprecia en la figura, la MPC es superior a la MBC y muy superior a la MIC.

Las concentraciones inferiores a la CIM no seleccionan mutantes resistentes porque no afectan al grueso de la población, pero las concentraciones superiores a la CIM inhiben o matan la mayoría de las células, favoreciendo la selección de las mutantes resistentes existentes en la población. Esto sucede, por ejemplo, con *S. pneumoniae* mutante en *gyrA* o *parC* (todavía sensible) cuando se expone a cualquier quinolona a dosis terapéuticas, una situación cuya consecuencia inevitable es un cultivo puro de *S. pneumoniae* con las dos mutaciones, el cual es clínicamente resistente (36). En general, cualquier dosis de quinolona que no supere la concentración preventiva de mutantes selecciona individuos con fenotipo resistente, lo que aumenta las probabilidades de fracaso terapéutico (38).

AMINOGLICÓSIDOS Y EFECTOS PERSISTENTES

El primer modelo que definió claramente la farmacodinamia de los aminoglicósidos fue el modelo en ratón neutropénico de la infección del muslo (16). Los aminoglicósidos, contrario a los (β -lactámicos, exhiben una actividad bactericida dependiente de la concentración y producen un prolongado efecto posantibiótico. El efecto posantibiótico es el tiempo requerido por una bacteria para crecer un logaritmo, una vez la concentración del antibiótico no sea detectable (39,40). Este fenómeno es característico de todos los antibióticos, especialmente contra bacterias Gram positivas. Pero, contra los bacilos Gram negativos, los efectos persistentes son importantes en aquellos compuestos cuyo blanco molecular es el ribosoma bacteriano (aminoglicósidos) o los ácidos nucleicos (quinolonas, rifamicinas) (41). Aunque los efectos persistentes se determinaron inicialmente *in vitro* (20,40), hoy sabemos que sus resultados son significativamente diferentes y menos exactos que los determinados *in vivo*, para lo cual se recurre especialmente al modelo en ratón (42,43).

La relevancia para las situaciones clínicas del efecto posantibiótico es incuestionable (22). El impacto más importante del efecto posantibiótico *in vivo* ha sido sobre los esquemas de dosificación de los antibióticos (44). Por ejemplo, una combinación fármaco/microorganismo que no demuestre efecto posantibiótico, requiere una administración más frecuente del medicamento (β -lactámicos) que las que exhiben un efecto posantibiótico prolongado (aminoglicósidos). De hecho, en los modelos animales se demostró que la administración una vez al día de los aminoglicósidos presentaba una eficacia bactericida similar o mayor que los esquemas de dosificación más frecuentes (45); este hallazgo se corroboró mediante ensayos clínicos (46).

En un estudio prospectivo doble ciego, 74 pacientes con infección bacteriana por Gram negativos fueron asignados aleatoriamente a uno de dos grupos, para evaluar la toxicidad que se presentaba luego de ser tratados con aminoglicósidos por más de 72 horas. En cada paciente se determinó la concentración sérica del aminoglicósido, así como las funciones renal y auditiva. De los 74 pacientes, 39 recibieron dos dosis diarias y 35 sólo una dosis diaria. La nefrotoxicidad se presentó en 6 de los 39 pacientes (15%) que recibieron el aminoglicósido cada 12 horas y en 0 de 35 pacientes (0%) tratados con un esquema de dosificación cada 24 horas. En dicho estudio, la probabilidad de un evento nefrotóxico fue influida significativamente por el uso concomitante de otro agente con idéntico potencial tóxico ($P = 0,001$) y por el esquema de dosificación ($P = 0,002$) (47).

Consideraciones finales

El éxito de la terapia antibiótica está determinado por una compleja interacción entre el medicamento administrado, el hospedero y el agente infeccioso. En el contexto clínico, la complejidad de esta interacción se refleja, usualmente, por la gran variabilidad en la relación dosis-respuesta. Para minimizar dicha variabilidad, se deben tomar en cuenta las características fundamentales del medicamento, el hospedero y el agente infeccioso, con el fin de seleccionar el antibiótico y la dosis apropiada (48).

Actualmente, la dosis y la selección del medicamento están relacionadas en parámetros

obtenidos *in vitro*, como la CIM, y en el perfil farmacocinético del medicamento. En la práctica, sin embargo, el efecto farmacodinámico *in vivo* es el resultado de la exposición dinámica del agente infeccioso a las fracciones libres del antibiótico en el sitio de la infección. Entonces, las condiciones de los estudios *in vitro* difícilmente reflejan las complejas condiciones *in vivo* (48). Además, las concentraciones séricas no necesariamente expresan las obtenidas en el tejido infectado. No obstante, la CIM permanece como el parámetro de laboratorio mejor establecido en microbiología y el más utilizado en farmacología para determinar la eficacia de los agentes antibióticos. Una vez determinados los parámetros farmacocinéticos de un agente en particular, las concentraciones del medicamento se correlacionan con la CIM para tomar la decisión sobre la dosificación.

Interpretación de las curvas farmacodinámicas obtenidas a partir del modelo animal

Aunque esta aproximación permite predecir la probabilidad de éxito que se obtendrá con un tratamiento, ahorra tiempo y costos, y evita exponer seres humanos en el diseño de los esquemas de dosificación de nuevos fármacos (49), es necesario tener en cuenta algunas particularidades del modelo animal para evitar errores en la interpretación de los datos, hecho frecuente en la literatura (50).

Al comparar la CIM con los datos fármaco-cinéticos obtenidos en plasma, dos factores pueden alterar los resultados: la unión a las proteínas y la distribución tisular de los medicamentos. Después de absorberse, la mayoría de los medicamentos se unen a las proteínas plasmáticas albúmina (~80%) y α_1 -glicoproteína (~20%). Tras su liberación de las proteínas, el medicamento puede dejar el plasma y difundir a los tejidos donde, de nuevo, se une inespecíficamente a proteínas tisulares o estructurales (51).

La unión a las proteínas es relevante debido a que sólo la fracción libre está disponible para ejercer el efecto farmacológico. Esta variable sigue los principios de la dinámica enzimática, incluida la especificidad del sustrato y la saturación del proceso (52). Hasta hace poco, era posible considerar que las concentraciones libres del antibiótico en suero y fluidos tisulares (órgano infectado) eran iguales en equilibrio asumiendo que el único tipo de distribución posible era la difusión pasiva (53). Ahora sabemos que el tiempo para alcanzar el equilibrio puede variar entre minutos y días, según factores como: 1) la relación entre la superficie de los capilares y el volumen del compartimento tisular; 2) las propiedades fisicoquímicas de la molécula; 3) la presencia de barreras anatómicas como las presentes en el sistema nervioso, la próstata y la placenta; 4) las alteraciones estructurales, especialmente en la pared de los capilares, y 5) la presencia de otros tipos de transporte, como las glicoproteínas P en el sistema nervioso central (54,55).

La distribución tisular es otra variable fármaco-cinética importante, dado que la mayoría de las infecciones ocurre en el espacio tisular intersticial (48). Las concentraciones tisulares insuficientes de un antibiótico pueden explicar algunas de las fallas terapéuticas cuando el antibiótico alcanza un perfil sérico apropiado contra un patógeno específico susceptible *in vitro* (48). Los modelos animales también han sido útiles para describir la relación entre las concentraciones séricas o plasmáticas y las alcanzadas en el sitio de la infección (49). En algunos de ellos, la concentración tisular del antibiótico se determina a partir de un homogenizado del órgano de choque del modelo, como el muslo o el pulmón, pero esta aproximación tiene el inconveniente de mezclar los compartimentos intersticial e intracelular (5,6).

La utilización *in vivo* de microdiálisis y de nuevas técnicas imaginológicas, como la gammagrafía planar bidimensional, permiten hoy determinar en los animales infectados el curso en tiempo real de las fracciones libres del medicamento en el tejido intersticial, evitando la contaminación con el antibiótico intracelular e intravascular, propia de los homogenizados totales (48,53).

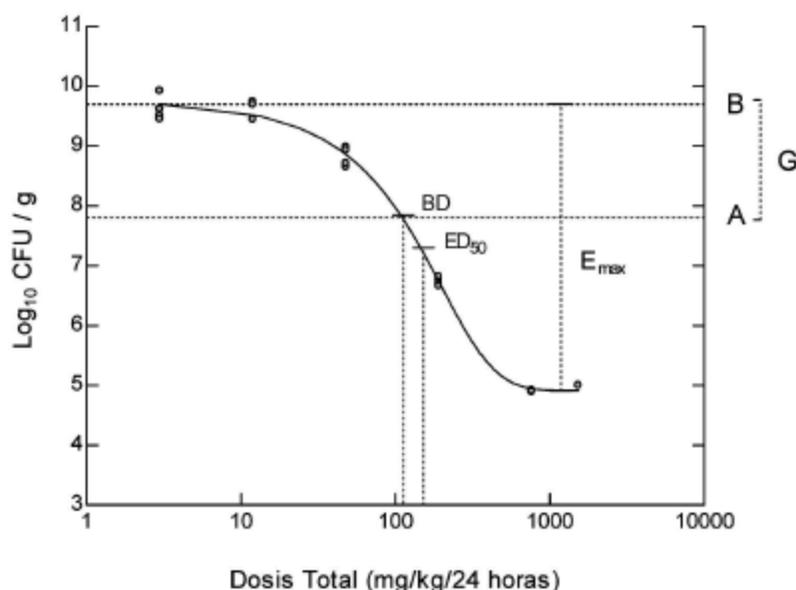
Existe, también, una considerable diferencia farmacocinética relacionada con la tasa metabólica entre roedores y humanos, pues la vida media de los antibióticos en ratones es 8 veces menor, aproximadamente. Esta circunstancia pierde importancia cuando se emplean los índices

farmacocinéticos y farmacodinámicos para predecir la eficacia, pues los mismos se mantienen constantes a través de diferentes especies de mamíferos, incluido el *H. sapiens* (5). Esto se explica por el diseño experimental necesario para identificar tales índices, que exige determinar y comparar la eficacia bactericida bajo múltiples esquemas de dosificación, con la misma dosis y con múltiples dosis, normalizando los parámetros farmacocinéticos de las diferentes especies. También es posible modificar la fármaco-cinética del animal para acercar las vidas medias plasmáticas a las observadas en el humano, mediante inducción de insuficiencia renal aguda, una estrategia que hace menos extenuantes los procesos experimentales al eliminar esquemas de dosificación tan frecuentes como cada una o tres horas (56). Muchos expertos evitan introducir esta variable por su impacto fisiológico en el modelo, difícil de controlar, y prefieren que sus colaboradores hagan el esfuerzo de inyectar los ratones cada hora o, incluso, a intervalos más frecuentes (4,18,56).

Desde el punto de vista farmacodinámico, la CIM provee información limitada sobre la cinética de la acción del medicamento. La CIM no suministra información sobre la magnitud de la actividad bactericida, ni predice cómo ni cuándo el incremento en la concentración de los antibióticos puede potenciar dicha actividad. Debido a que la determinación de la CIM se hace con inóculos bacterianos estandarizados en $5-6 \log_{10}$ CFU/ml, el comportamiento *in vivo* de los antibacterianos puede no ser el esperado a partir de la susceptibilidad predicha *in vitro* por la CIM. Esto ocurre porque en el enfermo el tamaño del inóculo es superior varias órdenes de magnitud (por ejemplo, $10 \log_{10}$ CFU/g en una neumonía), lo que desvía la CIM hacia la derecha (*inoculum effect*). Como los índices farmacocinéticos y farmacodinámicos tienen en cuenta la cantidad de antibiótico disponible en el sitio de la infección (farmacocinética) además de la CIM (farmacodinamia), su empleo en la clínica nos permite predecir fallas durante el tratamiento, con obvio beneficio para el paciente (5,26,45,56).

Debido a que la eficacia de los antibióticos proviene de curvas dosis-respuesta, el crecimiento bacteriano en los animales sin tratar (grupo control) será el valor de referencia para calcular el E_{max} de un fármaco obtenido tras su administración en los grupos experimentales (tratados). Los crecimientos inferiores a $1,5-2,0 \log_{10}$ CFU/g se consideran inapropiados para determinar la eficacia bactericida de los antibióticos pues, generalmente, representan bacterias metabólicamente inactivas e impiden valorar la eficacia bactericida de los antibióticos (45).

A modo de ejemplo, la [figura 5](#) presenta una curva dosis-respuesta obtenida al cabo de 24 horas de tratamiento con gentamicina en ratones neutropénicos infectados con *Escherichia coli* SIG-1 (cepa clínica). Obsérvese que los parámetros farmacodinámicos E_{max} , DE_{50} y dosis bacteriostática se pueden extraer directamente de la curva de regresión no lineal. En este caso, el número de bacterias por gramo de tejido en los animales control, en el momento de iniciar el tratamiento, fue $7,8 \log_{10}$, mientras que al cabo de 24 horas se obtuvo $9,8 \log_{10}$, para un crecimiento neto de $2 \log_{10}$ CFU/g. Las dosis inferiores a 100 mg/kg por día permitieron el crecimiento bacteriano en los animales tratados (dosis inefectivas), mientras que con 128 mg/kg por día se logró inhibir el crecimiento del microorganismo *in vivo* (dosis bacteriostática); el efecto bactericida se presentó entre 128 y 768 mg/kg por día. Si en vez de gentamicina se hubiera utilizado en el experimento un antibiótico cuyo mecanismo de acción dependa de que las bacterias se encuentren metabólicamente activas (por ejemplo, β -lactámicos y glicopéptidos) y el crecimiento bacteriano no hubiese superado $1 \log_{10}$ CFU/g en 24 horas, la curva dosis-respuesta probablemente representaría la supremacía de dosis inefectivas (parte superior de la curva) y el E_{max} se acercaría erróneamente a la dosis bacteriostática.

Figura 5

Relación entre la dosis y el número de unidades formadoras de colonia (CFU) de *Escherichia coli* SIG-1 recuperados de los muslos de ratones neutropénicos al cabo de 24 horas de tratamiento con gentamicina (3-1.563 mg/kg/día). Cada punto representa un ratón (promedio de ambos muslos). El crecimiento bacteriano obtenido en los controles no tratados (G) se obtiene restando el número de bacterias al comenzar el tratamiento (A) del número de bacterias en los animales no tratados al finalizar el experimento (B). El efecto producido por cada dosis de antibiótico se obtiene restando el número de bacterias en los animales tratados de valor de B. En la curva farmacodinámica se aprecia el efecto máximo ($E_{max} = 1.536$ mg/kg), la dosis requerida para alcanzar efecto bacteriostática (BD = 117 mg/kg), y la dosis requerida para alcanzar el 50% del E_{max} (ED₅₀ = 196 mg/kg).

CONCLUSIÓN

Los modelos animales de infección son una herramienta científica indispensable para confirmar los hallazgos obtenidos mediante pruebas *in vitro* y predecir los resultados clínicos que se obtendrán con un antibiótico. El modelo en ratón neutropénico de la infección del muslo es considerado una herramienta vital para el conocimiento de la farmacología de los antibióticos debido a que ha permitido, entre otros aspectos: 1) describir cuantitativamente la eficacia de los antibióticos; 2) estudiar de cerca los factores involucrados en la relación entre hospedero, el microorganismo y el fármaco; 3) definir los índices farmacocinéticos y farmacodinámicos que predicen la actividad bactericida de los antibióticos, y 4) determinar la magnitud de dichos índices. Todos estos aspectos son fundamentales en el momento de establecer esquemas de dosificación que garanticen altas probabilidades de éxito terapéutico y mínimas probabilidades de seleccionar bacterias resistentes.

REFERENCIAS

1. Moellering RC Jr. Principles of anti-infective therapy. En: Mandell G, Bennett J, Dolin R, editors. Principles and practice of infectious diseases. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000. p.223-33.

2. **Madoff LC, Kasper DL.** Introduction to infectious diseases: host-parasite interactions. En: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ *et al.*, editors. Harrison's Principles of Internal Medicine. 14th ed. New York: McGraw-Hill; 1998. p.749-54.
3. **Zak O, Sande MA.** Introduction: the role of animal models in the evaluation of new antibiotics. En: Zak O, Sande MA, editors. Experimental models in antimicrobial chemotherapy, Isted. London: Academic Press; 1986. p.1-5.
4. **Leggett je, Fantin B, Ebert S, Totsuka K, Vogelman B, Cálame W, Mattie H, Craig WA.** Comparative antibiotic dose-effect relations at several dosing intervals in murine pneumonitis and thigh-infection models. J Infect Dis 1989;159:281-92.
5. **Craig WA.** Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. Clin Infect Dis 1998;26:1-10.
6. **Andes D, Craig WA.** Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: a critical review. Int J Antimicrob Agents 2002;19:261-8.
7. **Norby SR, O'Reilly T, Zak O.** Efficacy of antimicrobial agent treatment in relation to treatment regimen: experimental models and clinical evaluation. J Antimicrob Chemother 1993;31(Suppl.D):41-54.
8. **Andes D, Anon J, Jacobs MR, Craig WA.** Application of pharmacokinetics and pharmacodynamics to antimicrobial therapy of respiratory tract infections. Clin Lab Med 2004;24:477-502.
9. **Acred P.** The Selbie or thigh lesion test. En: Zak O, Sande MA, editors. Experimental models in antimicrobial chemotherapy, Isted. London: Academic Press; 1986. p. 109-20.
10. **Selbie FR.** Comparison of sodium and procaine penicillin in treatment of experimental staphylococcal infection in mice. Br Med J 1954;4875:1350-3.
11. **Hunter PA, Rolinson GN, Witting DA.** Comparative activity of amoxicillin and ampicillin in an experimental bacterial infection in mice. Antimicrob Agents Chemother 1973;4:285-93.
12. **Dijkmans BA, Mattie H, Hermans J, van Furth R.** Quantification of the effect of anti-anaerobic drugs in experimental *Bacteroides fragilis* infection in mice. J Antimicrob Chemother 1984;13:79-86.
13. **Dijkmans BA, Vaishnav J, Mattie H.** Relative antibacterial efficacy of clindamycin and metronidazole against *Bacteroides fragilis* in vitro and in experimentally infected mice. Chemotherapy 1985; 31:297-303.
14. **Kunin CM.** Dosage schedules of antimicrobial agents: a historical review. Rev Infect Dis 1981;3:4-11.
15. **Gerber AU, Vastóla AP, BrandelJ, Craig WA.** Selection of aminoglycoside-resistant variants of *Pseudomonas aeruginosa* in an *in vivo* model. J Infect Dis 1982;146:691-7.
16. **Salazar B, Zuluaga A, Rodriguez C, Agudelo M, VesgaO.** Determinación de la profundidad y duración de la neutropenia inducida por ciclofosfamida en ratones hembras MPF de la cepa Udea:ICR(CD-I) Iatreia2004;17:173.
17. **Eagle H, Fleishman R, Levy M.** Continuous versus discontinuous therapy with penicillin: the effect of interval between injections on therapeutic efficacy. N EnglJMed 1953;248:481-8.
18. **Vogelman B, Gudmundsson S, Leggett J, Turnidge J, Ebert S, Craig WA.** Correlation of antimicrobial pharmacokinetic parameters with therapeutic efficacy in an animal model. J Infect Dis 1988;158:831-47.

19. **Craig WA**. Does the dose matter? *Clin Infect Dis* 2001;33(Suppl.3):S233-7.
20. **Eagle H**. The recovery of bacteria from the toxic effects of penicillin. *J Clin Invest* 1949;28:832-6.
21. **Eagle H, Musselman AD**. The spirocheticidal action of penicillin *in vitro* and its temperature coefficient. *J Exptl Med* 1944;80:493-505.
22. **Craig WA, Gudmundsson S**. Postantibiotic effect. En: Lorian V, editor. *Antibiotics in laboratory medicine*. 4th ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1996. p. 296-329.
23. **Craig WA**. Basic pharmacodynamics of antibacterials with clinical applications to the use of a-lactams, glycopeptides, and linezolid. *Infect Dis Clin North Am* 2003;17:479-501.
24. **Andes D**. Clinical pharmacodynamics of antifungals. *Infect Dis Clin North Am* 2003;17:635-649.
25. **Craig WA**. Interrelationship between pharmacokinetics and pharmacodynamics in determining dosage regimens for broad-spectrum cephalosporins. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995;22:89-96.
26. **Drusano GL**. Antimicrobial pharmacodynamics: critical interactions of 'bug and drug'. *Nat Rev Microbiol* 2004;2:289-300.
27. **Drusano GL**. Prevention of resistance: a goal for dose selection for antimicrobial agents. *Clin Infect Dis* 2003;36(Suppl.1):S42-50.
28. **Madaras-Kelly KJ, Ostergaard BE, Hovde LB, Rotschafer JC**. Twenty-four-hour area under the concentration-time curve/MIC ratio as a generic predictor of fluoroquinolone antimicrobial effect by using three strains of *P. aeruginosa* and *in vitro* pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemo-ther* 1996;40:627-32.
29. **Lister PD, Sander CC**. Pharmacodynamic of levofloxacin and ciprofloxacin against *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 1999;43:79-86.
30. **Drusano GL, Johnson DE, Rosen M, Standiford HC**. Pharmacodynamics of a fluoroquinolone antimicrobial agent in a neutropenic rat model of *Pseudomonas aeruginosa* sepsis. *Antimicrob Agent Chemother* 1993;37:483-90.
31. **Andes DR, Craig WA**. Pharmacodynamics of fluoroquinolones in experimental models of endocarditis. *Clin Infect Dis* 1998;27:47-50.
32. **Forrest A, Chodosh S, Amantea MA, Collins DA, Schentag 33**. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral grepafloxacin in patients with acute bacterial exacerbations of chronic bronchitis. *J Antimicrob Chemother* 1997;40(Suppl.A):45-57.
33. **Ambrose PG, Bhavnani SM, Owens Jr RC**. Clinical pharmacodynamics of quinolones. *Infect Dis Clin North Am* 2003;17:529-43.
34. **Merriken DJ, Briant J, Rolinson GN**. Effect of protein binding on antibiotic activity *in vivo*. *J Antimicrob Chemother* 1983;11:233-8.
35. **Blaser J, Stone BB, Groner MC, Zinner SH**. Comparative study with enoxacin and netilmicin in a pharmacodynamic model to determine importance of ratio of antibiotic peak concentration to MIC for bactericidal activity and emergence of resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1987;31:1054-60.
36. **Firsov A, Vostrov S, Lubenko I et al**. *In Vitro* pharmacodynamic evaluation of the mutant selection window hypothesis: four fluoroquinolones against *S. aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:1604-13.

37. **Dong Y, Zhao X, Doagala J, Drlica K.** Effect of fluoroquinolone concentration on selection of resistant mutants of *Mycobacterium bovis* BCG and *Staphy-lococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:1756-8.
38. **Drlica K.** The mutant selection windows and antimicrobial resistance. J Antimicrob Chemother 2003;52:11-7.
39. **Mouton JW, Dudley MN, Cars O, Derendorf H, Drusano GL.** Standardization of pharmacokinetic/ pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs. IntJ Antimicrob Agents 2002;20:355-8.
40. **Bundtzen RW, Gerber AU, Cohn DL, Craig WA.** Postantibiotic suppression of bacterial growth. Rev Infect Dis 1981;3:28-37.
41. **Craig WA.** Post-antibiotic effects in experimental infection models: relationship to *in vitro* phenomena and to treatment of infections in man. J Antimicrob Chemother 1993;31(Suppl.D): 149-58.
42. **Vogelman B, Gudmundsson S, Turnidge J, Leggett J, Craig WA.** *In vivo* postantibiotic effect in a thigh infection in neutropenic mice. J Infect Dis 1988;157:287-98.
43. **Fantin B, Ebert S, Leggett J, Vogelman b, Craig WA.** Factors affecting duration of *in vivo* postantibiotic effect for aminoglycosides against gram-negative bacilli. J Antimicrob Chemother 1991;27:829-36.
44. **den Hollander JG, Fursted K, Verbrugh HA, Mouton JW.** Duration and clinical relevance of postantibiotic effect in relation to the dosing interval. Antimicrob Agents Chemother 1998;42:749-54.
45. **Craig WA, Redington J, Ebert SC.** Pharmaco-dynamics of amikacin *in w'froand* in mouse thigh and lung infections. J Antimicrob Chemother 1991; 27(Suppl.C):29-40.
46. **Gilbert, DN.** Once-daily aminoglycoside therapy. Antimicrob Agents Chemother 1997;35:399-405.
47. **Rybak MJ, Abate BJ, Kang SL, Ruffing MJ, Lerner SA, Drusano GL.** Prospective evaluation of the effect of an aminoglycoside dosing regimen on rates of observed nephrotoxicity and ototoxicity. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:1549-55.
48. **Liu P, Derendorf H.** Antimicrobial tissue concentration. Infect Dis Clin North Am 2003;17:599-613.
49. **Müller M, De La Peña A, Derendorf H.** **Issues in** pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: kill curves *versus* MIC. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:369-77.
50. **Forrest A, Nix DE, Ballow CH, Goss TF, Birmingham MC, Schentag 33.** Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients. Antimicrob Agents Chemother 1993;37:1073-81.
51. **Derendorf,H.** Pharmacokinetic evaluation of beta-lactam antibiotics. J Antimicrob Chemother 1989; 24:407-13.
52. **Wilkinson GR.** Pharmacokinetics. En: Hardman JG, Limbird LE, Gilman A, editors. The pharmacological basis of therapeutics. 10th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p.3-30.
53. **Müller M, De La Peña A, Derendorf H.** **Issues in** pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: distribution in tissue. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:1441-53.

54. **Barza M, Cuchural G.** General principles of antibiotic tissue penetration. *J Antimicrob Chemother* 1985;15(Suppl.A):59-75.

55. **Andes DR, Craig WA.** Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibiotics in meningitis. *Infect Dis Clin North Am* 1999;13:595-618.

56. **Gerber All, Craig WA, Brugger h-P, Feller C, Vastóla AP, Brandel J.** Impact of dosing intervals on activity of gentamycin and ticarcillin against *Pseudomonas aeruginosa* in granulocitopenic mice. *J Infect Dis* 1983;147:910-7.

57. **Flückiger U, Segessenmann C, Gerber AU.** Integration of pharmacokinetics and pharmacodynamics of imipenem in a human-adapted mouse model. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:1905-10.

© **2011 Asociación Colombiana de Infectología.**

Calle 118 No. 15-24 Oficina 503, Bogotá, D. C., Colombia
Teléfono 215 3714 y 215 3517


acin@etb.net.co